

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Departamento de Química

“Pesquisa de factores de virulência em estirpes de  
*Escherichia coli* em resíduos de produção animal”



Maria José Realinho Gonçalves Correia

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia  
da Universidade Nova de Lisboa para obtenção do grau de  
Mestre em Biotecnologia

Orientadores científicos  
Professora Doutora Ana Silveira e Professor Doutor José Paulo  
Sampaio

Lisboa 2011

“Pesquisa de factores de virulência em estirpes de  
*Escherichia coli* em resíduos de produção animal”

Figura da capa: Adaptação da reprodução de *E. coli* de Jerram, (2010)

“Messieurs, c’est les microbes qui auront le dernier mot.”  
Pasteur

Aos meus pais e ao Afonso

## ÍNDICE

---

Sumário	vi
Abstract	viii
Agradecimentos	x
Lista de abreviaturas	xii
<b>Capítulo 1. Introdução</b>	<b>1</b>
1.1. Resíduos de produção animal	1
1.1.2. Perspectiva europeia	2
1.1.3. Impactos ambientais gerados pelos resíduos de produção animal	3
1.1.4. Aspectos legislativos	5
1.1.5. Tecnologias e métodos de tratamento	5
1.2. <i>Escherichia coli</i>	7
1.2.1. História e características principais	7
1.2.2. Patotipos	9
1.3. EPEC - <i>E. coli</i> enteropatogénica	11
1.3.1. Patogeneidade	11
1.3.2. Habitat natural e transmissão	12
1.3.3. Aspectos epidemiológicos	13
1.4. ETEC - <i>E. coli</i> enterotoxigénica	13
1.4.1. Patogeneidade	13
1.4.2. Factores de virulência	14
1.4.3. Aspectos epidemiológicos	14
1.5. VTEC/EHEC- <i>E. coli</i> verotoxigénica/ <i>E. coli</i> enterohemorrágica	15
1.5.1. História e definições	15
1.5.2. Patogeneidade	18
1.5.2.1. Mecanismo de patogeneidade	18
1.5.2.2. Verotoxinas/Shigatoxinas	18
1.5.3. Habitat natural e transmissão	20
1.5.4. Aspectos epidemiológicos	21
1.6. EIEC- <i>E. coli</i> enteroinvasiva, EAEC- <i>E. coli</i> enteroagregativa, DAEC- <i>E. coli</i> com aderência difusa	24
1.6.1. Patogeneidade	24
1.6.2. Aspectos epidemiológicos	24
1.7. Toxinas hemolíticas de <i>E. coli</i>	25
1.8. Métodos de detecção	27
1.8.1. Métodos baseados em características fenotípicas	27
1.8.2. Métodos moleculares	28
1.9. Objectivo	29

<b>Capítulo 2. Materiais e métodos</b>	30
2.1. Parte experimental	30
2.1.1. Selecção das explorações agropecuárias	30
2.2. Métodos	30
2.2.1. Métodos analíticos para a caracterização físico-química	31
2.2.2. Macronutrientes NPK e metais pesados	31
2.3. Métodos para a caracterização microbiológica	33
2.3.1. Protocolo 1	33
2.3.2. Protocolo 2	36
2.4. Conservação das culturas	38
2.5. Crescimento em meios de glucose e sorbitol	38
2.6. Pesquisa de produção de hemolisinas	39
2.7. Pesquisa de genes de virulência	40
2.7.1. Estirpes de controlo	40
2.7.2. Extracção de DNA	41
2.8. PCR	41
2.8.1. Protocolos utilizados nas reacções de PCR	43
2.9. Sequenciação de DNA	45
2.10. Análise estatística	45
 <b>Capítulo 3. Apresentação e discussão dos resultados</b>	 46
3.1. Análises físico-químicas	46
3.2. Análises microbiológicas	50
3.3. Ensaio de crescimento em glucose e sorbitol	52
3.4. Actividade hemolítica	54
3.5. Pesquisa de genes de virulência por PCR	56
3.5.1. Sequenciação	63
 <b>Capítulo 4. Considerações finais e perspectivas futuras</b>	 65
4.1. Considerações finais	65
4.2. Perspectivas futuras	67
 <b>Capítulo 5. Referências bibliográficas</b>	 68

## SUMÁRIO

---

De entre os resíduos orgânicos gerados com interesse agrícola, os provenientes das explorações agro-pecuárias são dos que levantam maiores preocupações em relação à sua gestão e destino final. É prática comum a aplicação dos resíduos de produção animal aos solos no sentido de se aproveitar as suas propriedades fertilizantes contudo, poderão ser fontes de poluição ambiental dos solos, das águas e do ar. Há uma imensa diversidade de microrganismos patogénicos e comensais presentes nos resíduos orgânicos entre os quais as bactérias, e mais particularmente estirpes patogénicas de *Escherichia coli* que, devido à sua elevada taxa de sobrevivência e persistência no ambiente podem ser transmitidas ao Homem e provocar graves patologias.

O objectivo do estudo foi pesquisar a presença de factores de virulência em estirpes de *E. coli* isoladas de amostras de resíduos de produção animal. Este estudo incidiu na caracterização físico-química e microbiológica de nove amostras de resíduos de produção animal (fracção sólida dos chorumes, estrumes e lamas) provenientes de oito explorações agropecuárias, seis suiniculturas, duas pecuárias e uma indústria de abate e processamento carnes de aves e situadas na Região de Lisboa e Vale do Tejo. Na caracterização físico-química foram medidos os parâmetros de pH, humidade, condutividade, cinzas, NPK (azoto orgânico, fósforo e potássio) e metais pesados. As análises microbiológicas efectuadas compreenderam a identificação e isolamento bacteriano, a detecção da actividade hemolítica e a pesquisa dos factores de virulência *vt<sub>1</sub>* e *vt<sub>2</sub>* (verotoxinas), *eaeA* (gene que codifica para a intimina), *st<sub>1</sub>* (toxina termo-estável), *lt* (toxina termo-lábil) EAF (factor de aderência de EPEC) e *ial* (invasion-associated locus) pela técnica de PCR.

Da colecção de 41 estirpes de *E. coli* isoladas, foram detectadas 10 estirpes com factores de virulência. Estas estirpes foram isoladas de amostras provenientes de suiniculturas e pecuárias, e foram potencialmente associadas aos patotipos de ETEC (enterotoxigénica),

EPEC (enteropatogénica) atípica e EHEC (enterohemorrágica) não-O157. Os resultados obtidos reforçam a necessidade de se efectuarem tratamentos adicionais aos resíduos orgânicos, no sentido de se obter um material de qualidade e isento de microrganismos patogénicos.

## ABSTRACT

---

Organic wastes from livestock production systems raises great concern regarding its management and final deposition. It is a common practice to apply waste from animal production to soils in order to benefit from its properties as a fertilizer. However this type of waste is pollution source and is sometimes the cause of environmental contamination. There is a huge diversity of pathogenic and commensal microorganisms present in the organic wastes, from which bacteria, particularly the pathogenic strains of *Escherichia coli*, which have high rate of survival and persistence in the environment, may be transmitted to humans and cause serious pathologies.

The aim of this study was the search the presence of virulence factors on *E. coli* strains from organic waste samples. In this work we performed the physical, chemical and bacteriological characterization of nine samples of organic waste from animal production, collected in eight livestock production systems, six from pig slurry, two from cattle manure and one from a poultry processing meat industry, all located in the Região de Lisboa e Vale do Tejo.

Physical and chemical parameters measured were pH, conductivity, humidity and ash content, NPK (organic nitrogen, phosphorus and potassium) and heavy metals content. Identification and isolation of bacteria, hemolytic activity detection and search for the virulence factors  $vt_1$  and  $vt_2$  (verotoxins), *eaeA* (gene encoding intimin),  $st_1$  (heat-stable toxin), Lt (heat-labile toxin), EAF (EPEC adherence factor) and *ial* (invasion-associated locus) using PCR techniques.

From a collection of 41 isolated strains of *E. coli*, ten strains from pigs slurry and livestock manure showed virulence factors were potentially associated to the pathotypes ETEC (enterotoxigenic), atypical EPEC (enteropathogenic) and EHEC (enterohemorrhagic) non-O157.



The results of this work enforce the need to perform additional treatment to organic waste from animal production, such as composting, in order to obtain a good quality and pathogen free product that can be safely applied to enhance agriculture soil properties.

## AGRADECIMENTOS

---

À Professora Doutora Ana Silveira o meu reconhecido agradecimento por ter aceite a orientação desta tese, pelas oportunidades e pelos ensinamentos transmitidos ao longo de todos os anos de trabalho conjunto. A sua ajuda e amizade, sempre presentes, em muito contribuíram para a minha formação científica, profissional e pessoal.

Ao Professor Doutor José Paulo Sampaio o meu reconhecido agradecimento por ter aceite a co-orientação desta tese, pelos conhecimentos transmitidos, pelas condições de trabalho proporcionadas e pelas suas sugestões e valiosas críticas transmitidas ao longo da realização desta tese.

Quero expressar o meu agradecimento à Professora Doutora Susana Barreiros, Coordenadora do Mestrado em Biotecnologia pelas facilidades que me proporcionou e em especial pela compreensão que demonstrou.

O meu apreço sincero a toda a colaboração prestada pela Professora Doutora Constança Pomba, da Faculdade de Medicina Veterinária. Agradeço também a sua disponibilidade e a sua amabilidade sempre presente.

À Dr<sup>a</sup> Natacha Couto, da Faculdade de Medicina Veterinária, agradeço o seu empenho, profissionalismo e simpatia na colaboração prestada na realização desta tese.

À Doutora Elisabete Valério, do Departamento de Ciências da Vida, pelo seu apoio imprescindível na parte experimental da tese. Agradeço os seus conhecimentos científicos, opiniões, paciência e amizade que sempre partilhou e demonstrou.

Um agradecimento às assistentes de laboratório do Departamento de Ciências da Vida, Ana Maria Pereira, Tânia Costa e Nicole Soares, e ainda à Sandra Alberto e Conceição

Capelo, secretárias do Departamento de Ciências e Engenharia do Ambiente, pelos apoios facultados no decorrer da parte experimental da realização da tese.

Aos colegas e amigos, Paula Sobral (Professora Doutora) um agradecimento pela sua amizade, pelos seus conselhos e paciência, à Graça Martinho (Professora Doutora) e ao Eduardo Mateus (Doutor) pela motivação e incentivo que sempre demonstraram e ainda à Tânia Rodrigues (Engenheira Química) pela ajuda e encorajamento na parte final da tese.

Ao meu irmão e à Maribela agradeço todo o apoio ao longo da realização desta tese.

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

AE	Lesão <i>attaching and affacing</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BFP	Bundle Forming Pili
CDC	Centro para a Prevenção e Controlo da Doença
CH	Colite Hemorrágica
CH <sub>4</sub>	Metano
CT-SMAC	Agar MacConkey sorbitol +cefixima+ telurite de potássio
DAEC	<i>E. coli</i> com Aderência Difusa
DE	Doença dos Edemas
DGV	Direcção Geral de Veterinária
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxinucleotídeos trisfosfato
EAF	Factor de Aderência de EPEC
EagEC	<i>E. coli</i> Enteroagregativa
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
EIEC	<i>E. coli</i> Enteroinvasiva
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EM	Estados Membros
EPEC	<i>E. coli</i> Enteropatogénica
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
EtBr	Brometo de etídio
ETEC	<i>E. coli</i> Enterotoxigénica
EUA	Estados Unidos da América
FMV	Faculdade de Medicina Veterinária
FS	Estirpe fermentadora de sorbitol
HUS	Síndrome Hemolítico-Urémico
<i>ial</i>	Invasion-associated locus

ICP-AES	Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy
IMS	Separação Imunomagnética
K <sub>2</sub> O	Óxido de potássio
KDa	KiloDalton (massa molecular)
KTon	Kilotonelada
LB	Meio Luria-Bertani
LEE	Ilha de patogeneicidade
LT	Enterotoxina termo labil
MDa	Mega Dalton (massa molecular)
ME	Margem de Erro
Mg(OAc) <sub>2</sub>	Acetato de magnésio
MT	Megatonelada
MUG	4-methylumbelliferyl-β-Dglucuronide
N <sub>2</sub> O	Óxido nitroso
NA	Nutriente Agar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NFS	Estirpe não fermentadora de sorbitol
NH <sub>3</sub>	Amoníaco
nm	Nanómetro
NPK	Azoto, fósforo e potássio
OIE	World Organisation for Animal Health
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Pentóxido de fósforo
PAH	Polycyclic Aromatic Biphenyls
Pb	Pares de bases
PCB	Polychlorinated Biphenyls
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulse Field Electrophoresis
pmoles	Picomoles
<i>Primer forward</i>	Iniciador directo
<i>Primer reverse</i>	Iniciador reverso
RFLP	Polimorfismo de Restrição

<i>Primers</i>	Iniciadores
REAP	Regime de Exercício de Actividade Pecuária
RNA	Ribonucleic acid
SMAC	Agar MacConkey lactose
ST	Enterotoxina termo estável
TAE	Tampão tris acetato
TBA	Trytone bile agar
TBX	Trytone bile glucuronide
TSA	Tryticase soy agar
TSB	Trytone soy broth
TTP	Púrpura Trombocitopénica Trombótica
UE	União Europeia
Ufc	Unidade formadora de colónias
UV	Radiação Ultra-Violeta
VTEC/EHEC	<i>E. coli</i> Verotoxigénica/ Enterohemorrágica
VT <sub>1</sub> , VT <sub>2</sub>	Verotoxinas
µm	Micrómetro

# CAPÍTULO 1

---

## INTRODUÇÃO

---

### 1.1 Resíduos de produção animal

As actividades agrícolas, particularmente aquelas que se relacionam com o sector agro-pecuário têm um impacto significativo em praticamente todos os aspectos do meio ambiente podendo conduzir a situações de poluição ambiental. É prática comum em muitos países a utilização na agricultura de resíduos orgânicos provenientes das explorações agropecuárias e agro-industriais como fertilizantes em solos agrícolas enquanto fonte de nutrientes para as culturas (Avery *et al.*, 2005). São de facto bastante ricos em termos energéticos e nutritivos e matéria orgânica. A adição de matéria orgânica aos solos, é um factor indispensável para a sua fertilidade na medida em que permite a protecção do solo contra a erosão hídrica e eólica, melhora a sua estrutura e a estabilidade bem como permite a nutrição da população microbiana do solo aumentando a sua actividade (Duffy, 2003; Islam *et al.*, 2005; Nicholson *et al.*, 2005). De entre os resíduos orgânicos gerados com interesse agrícola, os provenientes das explorações agro-pecuárias, suscitam grandes preocupações porque, são produzidos em grandes quantidades, e porque podem causar contaminação do ambiente (Gonçalves, 2005).

Os resíduos orgânicos produzidos nas explorações agro-pecuárias definem-se com chorumes, estrumes, águas residuais e lamas de depuração resultantes do tratamento dos efluentes das unidades de criação intensiva, designadamente das suiniculturas. Chorume é a *mistura dos dejectos sólidos e líquidos dos animais com maior ou menor grau de diluição, contendo, por vezes restos de rações, palhas e de fenos*, enquanto que estrume é a *mistura dos dejectos sólidos com as palhas das camas dos animais*. Entende-se por lamas de depuração *as lamas provenientes de estações de tratamento de águas residuais de actividades agro-pecuárias, também lamas provenientes de*

estações de tratamento de águas residuais (ETAR) domésticas ou urbanas e de outras estações de tratamento de águas residuais de composição similar às águas residuais domésticas e urbanas (Soveral Dias, 1998).

### 1.1.2 Perspectiva europeia

A actividade agropecuária na União Europeia (UE) com os 27 Estados Membros é dominada actualmente pela produção de gado bovino, de suínos e aves. Na década de noventa, as explorações agropecuárias distribuíam-se pelos países da Europa Central, actualmente, o desenvolvimento dos mercados e políticas governamentais inverteram o cenário e contribuíram para uma aglomeração massiva de explorações na Bélgica, Holanda, França e Itália (Oenema *et al.*, 2007). Com surpresa, verifica-se entre os países da EU a 27, uma enorme variação na terminologia, na gestão e também escassez de informação quanto ao processamento dos resíduos. As instalações, alimentação, manuseamento dos resíduos, condições climáticas e estruturais são alguns dos factores que contribuem para a diversidade entre os países (Westerman e Bicudo, 2005). Um estudo da FAO *Recycling of Agricultural, Municipal and Industrial Residues in Agriculture* (RAMIRAN, 2002) sobre gestão de resíduos em 27 países da Europa, reporta sobre a situação da gestão, produção, processamento e composição dos resíduos de produção animal (suínos e gado bovino) nos diferentes países. A Figura 1.1 apresenta o mapa europeu referente à contribuição do gado bovino e suíno para a produção total de resíduos de produção animal (chorumes e estrumes).

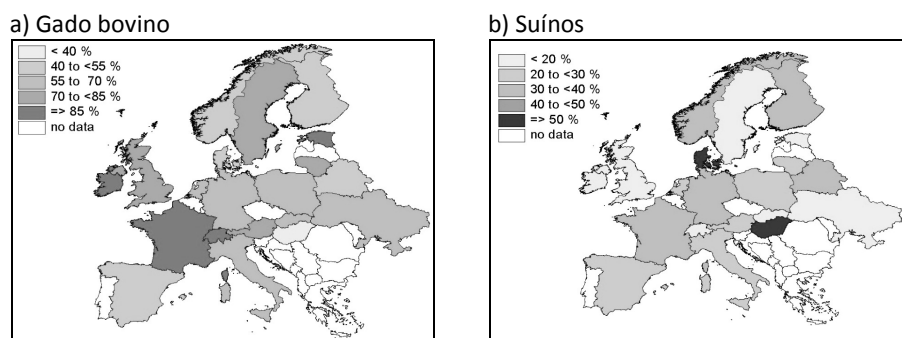


Figura 1.1: Contribuição em (%) do gado bovino (a) e suíno (b) para a produção total de resíduos de produção animal (chorumes e estrumes). Adaptada de RAMIRAN, 2002.



Excepto a Dinamarca e Hungria, a produção de gado bovino em percentagem tem uma contribuição largamente superior para a produção total de resíduos de produção animal na Europa (Figura 1.1). Na maioria dos países a produção bovina situa-se entre 40-70 % da produção total de resíduos, mas na Suíça, Irlanda, e França é superior a 85%. A produção suinícola contribui com menos de metade da produção total na Dinamarca e Hungria, na maioria dos países a sua contribuição é 20 a 40%. Portugal não tem informação disponível (RAMIRAN, 2002).

### 1.1.3 Impactos ambientais gerados pelos resíduos de produção animal

As actividades das pecuárias intensivas são, muitas vezes, responsáveis por importantes emissões de gases para a atmosfera, nomeadamente o amoníaco ( $\text{NH}_3$ ). As emissões são originárias de processos biológicos, físicos e químicos associados à degradação da matéria orgânica durante os processos de tratamento, o armazenamento dos estrumes e chorumes e o espalhamento destes materiais no solo (Petersen *et al.*, 2007).

O solo está muito condicionado aos usos a que está sujeito, nomeadamente, às práticas de culturas inadequadas, remoção da vegetação natural que retém o solo, presença de contaminantes nos resíduos que se lhe aplicam, tais como metais pesados, micropoluentes orgânicos e microrganismos patogénicos arriscando à sua dispersão no meio (Calouro, 2005; FAO, 2006). A contaminação do solo pode ter origem em diversos factores, alguns naturais e outros provocados pela intensificação das actividades agrícolas. Assim, a aplicação sucessiva de efluentes líquidos das pecuárias intensivas, estrumes, lamas de depuração, ou água contaminada, podem levar a processos de contaminação lenta e acumulativa.

A origem da contaminação por metais pesados é diversa. Desde a corrosão dos metais usados na construção das explorações, desinfectantes agressivos usados em lavagens e a incorporação de alguns metais, como o zinco e cobre na dieta de animais como suplemento nutricional. Uma grande percentagem destes metais é excretada nos dejectos e/ou urina, e incorporados nos resíduos que de um modo geral, são aplicados ao solo (Nicholson *et al.*, 1999; Petersen *et al.*, 2007).

A gestão deficiente dos resíduos nas explorações agro-pecuárias e a utilização excessiva de fertilizantes são, entre outros, factores responsáveis pela contaminação da água. Esta contaminação pode ser devida a descargas directas nos leitos de água de efluentes das explorações pecuárias contendo altos teores em nitratos e microrganismos patogénicos, entre outras fontes de contaminação com origem nas actividades agro-pecuárias. Os nitratos constituem um grave problema ambiental, no sentido em que são um dos componentes de adubos químicos, e um dos produtos de mineralização de azoto contido em estrume e outros resíduos orgânicos, águas residuais ou lamas de depuração (Soveral Dias, 1998; Gonçalves, 2005).

Antes do advento dos fertilizantes inorgânicos, os resíduos de produção animal eram a única fonte de nutrientes para as culturas e a sua aplicação como fertilizantes é praticada há vários séculos (Venglovsky *et al.*, 2006). A presença de microrganismos patogénicos e a sua potencial transmissão ao homem e animais por aplicações de resíduos não tratados é conhecida há mais de um século (Gerba e Smith, 2005).

Há uma imensa diversidade de microrganismos potencialmente patogénicos e comensais presentes nos resíduos orgânicos. Foram identificados mais de 150 microrganismos de várias espécies como bactérias, consideradas as principais agentes de contaminação, vírus e protozoários. São exemplo de bactérias a *Salmonella*, *Yersinia*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Brucella* spp., *Listeria*, *Mycobacterium* spp. entre outras (Bicudo e Goyal, 2003; Guan e Holley, 2003; Gerba e Smith, 2005; Hutchison *et al.*, 2005; Nicholson *et al.*, 2005).

Embora só uma pequena percentagem dos microrganismos seja patogénica, está bem documentada a persistência desses microrganismos nos resíduos de produção animal em particular, estirpes patogénicas de *E. coli*. (Larney *et al.*, 2003; Avery *et al.*, 2005; Gerba e Smith, 2005; Nicholson *et al.*, 2005; Heinonen-Tanski *et al.*, 2006; Sinton *et al.*, 2007). As estirpes patogénicas de *E. coli* são versáteis, extremamente persistentes e com elevada taxa de sobrevivência no solo, em estrumes, nas lamas, em dejectos de animais mesmo em temperaturas baixas incluindo temperaturas negativas (Duffy, 2003; Guan e Holley, 2003). Note-se a sobrevivência da estirpe patogénica de *E. coli* O157:H7

durante 99 dias no solo com flutuações de temperatura de -6,5 a 19,6°C e durante dois meses em solo fertilizado com estrume (Guan e Holley, 2003; Mukherjee *et al.*, 2006)

#### 1.1.4 Aspectos legislativos

O Decreto-Lei nº214/2008 de 10 de Novembro estabelece o regime de exercício da actividade pecuária (REAP). Define efluentes pecuários como o estrume e o chorume, e estabelece ainda o regime a aplicar às actividades de gestão, por valorização ou eliminação, dos efluentes pecuários, anexas a explorações pecuárias ou autónomas, isto é, às unidades intermédias, aos entrepostos de fertilizantes orgânicos e às unidades de compostagem, de produção de biogás. A utilização das lamas é regulamentada a nível nacional pelo Decreto-Lei nº 276/2009, de 21 Junho, que transpõe para o direito nacional a Directiva 86/278/ EEC. Neste diploma encontram-se estabelecidos os valores limites de concentração de metais pesados e quantidades máximas permitidas, valores limites de microrganismos, valores limites para poluentes orgânicos (polycyclic aromatic biphenyls PAHs, polychlorinated biphenyls PCBs, dioxinas e furanos) que podem ser introduzidos nos solos. Têm vindo a ser produzidos na EU, documentos legislativos e normativos e códigos de boas práticas, com o objectivo da redução e valorização dos resíduos orgânicos, completando os diversos componentes da gestão desde a produção e processamento até à utilização na agricultura. A 3ª versão do *Working Document on Sludge* (2000) recomenda a aplicação de lamas ao solo quando tenham valor agronómico de acordo com as necessidades das culturas.

#### 1.1.5. Tecnologias e métodos de tratamento

Os sistemas de tratamento dos resíduos orgânicos têm o objectivo da redução de odores e do seu potencial poluente para valorização energética visando a sua utilização na agricultura. No caso das agro-indústrias de abate e processamento de carnes, caracterizam-se geralmente, pela presença de gradagem seguida de tamisação. Seguidamente, o processo inclui o tratamento primário através de um processo químico/físico que envolve a decantação de partículas sólidas em suspensão, o

tratamento secundário que envolve um tratamento biológico e o tratamento terciário que consiste na afinação do efluente (Silveira *et al.*, 2005; Hjorth *et al.*, 2010).

Os métodos de tratamento para os resíduos das explorações agropecuárias considerados os mais viáveis são a separação sólido-líquido e os métodos biológicos como a compostagem e a digestão anaeróbia. A separação de sólidos é um processo físico que permite separar a componente sólida dos efluentes líquidos precipitada ou em suspensão (FAO, 2006; Garcia *et al.*, 2009). Desta separação resulta uma fase líquida, com menor potencial poluente que os chorumes em termos de nutrientes e carência química de oxigénio, e pode ser bombeada e submetida a tratamentos que, geralmente consistem num sistema de lagoas colocadas em série. A fase sólida do chorume com teor mais elevado em matéria orgânica e nutrientes pode ser valorizada através da compostagem e utilizada como fertilizante (Gonçalves, 2005).

A compostagem é um processo de valorização dos resíduos que se baseia na decomposição da matéria orgânica por via aeróbia por acção dos microrganismos (Turner, 2002; Guan e Holley, 2003; Silveira *et al.*, 2005). A configuração do sistema de compostagem assenta na formação de pilhas, em condições controladas de temperatura, nutrientes, arejamento e revolvimentos periódicos. Este processo permite a produção de um material estabilizado e higienizado com valor agrícola designado por composto (Silveira *et al.*, 2005; Heinonen-Tanski *et al.*, 2006).

A digestão anaeróbia também chamada de fermentação constitui um processo biológico em que a decomposição dos resíduos orgânicos é feita na ausência de oxigénio. É um processo natural em que há transformação da matéria orgânica numa mistura gasosa, o biogás, constituída por metano e dióxido de carbono. A densidade de microrganismos pode ser reduzida se o processo for conduzido a uma temperatura elevada, superior a 50 °C. A integração deste sistema nos planos de tratamento de efluentes de explorações agro-pecuárias é vantajosa, no sentido em que a produção de biogás pode ser utilizada nas instalações e/ou vendida e os microrganismos patogénicos são eliminados ou reduzidos de uma forma eficaz (Tanski-Heinonen *et al.*, 2006).

Diversos estudos referem que a comunidade microbiana, incluindo os microrganismos patogénicos diminuem, exponencialmente durante o tempo de armazenagem, cerca de 90% são destruídos, prevalecendo uma comunidade microbiana mais estável e composta por microrganismos dominantes (Heinonen-Tanski *et al.*, 2006; Peu *et al.*, 2006). Os resíduos orgânicos, particularmente os estrumes, podem ser armazenados em locais próprios tendo em conta a produção diária das pecuárias, e de dimensão adequada para armazenar o que é produzido durante o período de tempo em que não é recomendável a sua aplicação ao solo, entre 3 a 4 meses, para garantir a eliminação dos microrganismos patogénicos que possuam boas capacidades de sobrevivência e persistência em diferentes condições ambientais (Duffy, 2003; Calouro, 2005).

Um dos métodos químicos de tratamento mais utilizados é a adição de cal, processo denominado de calagem, que se baseia no aumento de pH que inactiva os microrganismos. A amónia libertada a pH elevado (superior a 10) é também inibitória para grande parte dos microrganismos patogénicos (Heinonen-Tanski *et al.*, 2006; Avery *et al.*, 2009).

Os métodos físicos englobam além da separação sólido-líquido, que como já foi referido anteriormente outros processos como a pasteurização tratamentos térmicos e o processo da incineração que é utilizado nalguns casos mas como última alternativa, pois ao destruir a matéria orgânica, em contraste com outros métodos, não gera um produto que possa ser usado com fertilizante (Pourcher *et al.*, 2005; Heinonen-Tanski *et al.*, 2006).

## 1.2 *Escherichia coli*

### 1.2.1 História e características principais

*Escherichia coli* foi descrita pela primeira vez pelo bacteriologista alemão Theodore Escherich em 1885, e que a denominou de *Bacillus coli*. Mais tarde surgiu o nome de *Escherichia coli*. Até 1950, foi considerada uma bactéria comensal no tracto intestinal do homem e dos animais de sangue quente mas, nas últimas décadas do século passado, como resultado de intensa pesquisa, *E. coli* foi considerada um importante agente

etiológico de enterites e várias patologias extra intestinais (Wasteson, 2001). De uma forma geral, a *E. coli* e os seus hospedeiros agem em simbiose, ou seja coexistem saudavelmente com mútuo benefício. É um microrganismo muito competitivo, explorando a sua habilidade de utilização do gluconato no cólon mais eficientemente do que outras espécies residentes (Kaper *et al.*, 2004). Em 1892, Shardingier propôs a bactéria *E. coli*, como um indicador de contaminação fecal, baseando-se na premissa de que este organismo era abundante em amostras fecais de seres humanos e de animais não sendo usualmente detectada noutros nichos ecológicos (FDA, 2002). Hoje em dia, a presença de *E. coli* em água é considerada indicativa de contaminação fecal, medida conhecida oficialmente como índice coliforme da água.

Apesar da *E. coli* ter como habitat natural o tracto intestinal de mamíferos, tem propriedades ubíquas, ou seja, a sua presença pode ser detectada na água, solo, ar, resíduos orgânicos de origem animal, sedimentos, produtos alimentares de origem animal e vegetal e em fezes de muitas espécies de animais domésticos e selvagens (Garcia-Aljaro *et al.*, 2005; Rava *et al.*, 2006; Gunn *et al.*, 2007; Wetzel e LeJeune, 2007; Duriez *et al.*, 2008; Duan *et al.*, 2009).

A classificação taxonómica da *E. coli* consiste em: Domínio-*Bacteria*, Filo-*Proteobacteria*, Classe-*Gammaproteobacteria*, Ordem-*Enterobacteriaceae*, Género-*Escherichia*, Espécie-*E. coli*. O género *Escherichia*, além da *E. coli* comporta também *E. fergusonii*, *E. hermanii*, *E. vulneris* e *E. blattae* (Freitas da Fonseca, 1998; Fonseca de Sousa, 2000). A *E. coli* é uma bactéria *Gram negativa*, tem a forma de bastonete, não é formadora de esporos. Possui parede celular, que actua como uma protecção, sendo constituída por peptidoglicano, proteínas, lipopolissacarídeos (LPS) e lípidos, sendo responsável pela morfologia bacteriana e pelo comportamento da bactéria à coloração de *Gram*. Possui apêndices de natureza proteica, que se projectam para o exterior da célula e que desempenham funções bem definidas, como os flagelos que são órgãos de locomoção, os *pilli* que são organelos que medeiam o contacto entre bactérias e as fímbrias que são estruturas filamentosas da superfície bacteriana mais finas que os flagelos e que facilitam a aderência a outras células sendo por isso designadas de adesinas fímbrias.,

Pode conter também plasmídeos, que são moléculas de DNA circular, que coexistem com o DNA cromossómico (Parente e Sousa, 1998). Em relação ao seu comportamento fisiológico, a *E. coli* cresce à temperatura de 37 °C, fermenta a glucose e lactose crescendo no agar MacConkey. Para a diferenciação e identificação das várias espécies do género *Escherichia* estão indicadas várias reacções bioquímicas, *E. coli* tem reacção positiva à produção de indol, à produção de lisina descarboxilase, também à produção de ornitina descarboxilase e positiva ao teste da  $\beta$ -galactosidade. Por outro lado, não produz acetoina nem citrato (Fonseca de Sousa, 2000). Existem no mercado testes bioquímicos rápidos e fiáveis que permitem a identificação de *E. coli*, nomeadamente os testes Api20E™ (BioMérieux®) (Bouvet *et al.*, 2002). É uma bactéria anaeróbia facultativa sendo capaz de crescer na presença e ausência de oxigénio. Sob condições anaeróbias utiliza o processo da fermentação produzindo uma mistura de gases e ácidos como produtos finais, é ácido tolerante e pode crescer a pH entre 4 a 10 (Fonseca de Sousa, 2000). A Figura 1.2 representa uma imagem da bactéria *E. coli* através de Microscopia de Força Atómica.



Figura 1.2: Imagem de *E. coli* por Microscopia de Força Atómica. Adaptada de Li (2010).

### 1.2.2 Patotipos

Algumas estirpes de *E. coli* adquiriram factores específicos de virulência que conferem à bactéria capacidade de criar um largo espectro de patologias em seres humanos e animais (Nataro e Kaper, 1998). Para distinguir *friends and foes*, ou seja, estirpes comensais de estirpes patogénicas, foram criadas as designações de patotipos / grupos

de patogeneidade baseados nos factores de virulência, mecanismo de patogeneidade, diagnósticos clínicos e serologia (Wasteson, 2001). Estão descritos na literatura seis patotipos de *E. coli*, todos eles associados a patologias do tracto intestinal, e são designados internacionalmente pelos acrónimos:

EPEC- *E. coli* enteropatogénica.

ETEC- *E. coli* enterotoxigénica.

VTEC/EHEC- *E. coli* verotoxigénica/ enterohemorrágica.

EIEC- *E. coli* enteroinvasiva.

EagEC- *E. coli* enteroagregativa.

DAEC- *E. coli* com aderência difusa.

De entre os patotipos de *E. coli* acima referidos, os patotipos de EPEC, ETEC e VTEC/EHEC são aqueles que mais se associam aos resíduos orgânicos provenientes das explorações agro-pecuárias. Tendo como reservatório natural o tracto intestinal de animais ruminantes e suínos, é implícito que elevadas concentrações destes organismos estejam presentes nas fezes destes animais e consequentemente nos resíduos de produção animal (Blanco *et al.*, 1997; Vernozy-Rozand *et al.*, 2002; Cortés *et al.*, 2005).

Para a identificação e diferenciação de cada estirpe de *E. coli*, foi proposto por Kauffman em 1944 uma classificação mediante as suas propriedades antigénicas, onde as estirpes são classificadas de acordo com os seus antígenos principais: o antígeno somático (LPS) *O* referente às moléculas de lipossacarídeos, o antígeno flagelar *H* que são proteínas constituintes dos flagelos e capsular *K* que são proteínas capsulares, segundo a forma **O: H: K**. O antígeno *O* define o serogrupo e a combinação específica entre os antígenos *O* e *H* define o serótipo de cada estirpe (Gyles, 2007). Dando um exemplo: o serótipo *E. coli* O157:H7 possui o antígeno somático (*O*) de tipo 157 e o antígeno flagelar (*H*) de tipo 7 (Constantiniu, 2002).

No âmbito deste trabalho ir-se-ão descrever de uma forma mais detalhada os patotipos de *E. coli* EPEC, ETEC e VTEC/EHEC.



### 1.3. EPEC - *E. coli* enteropatogénica

#### 1.3.1 Patogeneidade

EPEC foi o primeiro grupo de estirpes patogénicas de *E. coli* a ser descrito. A patogeneidade das estirpes EPEC é caracterizada pela produção de uma lesão AE *attaching and effacing*, resultado de uma interacção específica entre a bactéria e as células eucarióticas, *in vivo* (Trabulsi *et al.*, 2002). O processo é caracterizado pela degeneração localizada das microvilosidades epiteliais intestinais, pela aderência da bactéria através da formação de um pedestal e a aglomeração de filamentos de actina polarizada do citoesqueleto nos locais de ligação da bactéria à célula hospedeira. A formação da lesão AE é essencial à patogeneidade de todas as estirpes EPEC. Uma histopatologia similar tem sido associada a outras estirpes patogénicas pertencentes ao patotipo de EHEC de *E. coli* (Frankel *et al.*, 1998).

Os genes necessários para a produção da lesão AE estão localizados numa ilha de patogeneidade situada no cromossoma, denominada de LEE *locus enterocyte effacement*, que contém, entre outros, os genes *eae* que codificam para a intimina. A intimina é uma proteína membrana de 94 kDa de massa molecular responsável pela aderência entre a bactéria e a célula hospedeira. Vários estudos revelam a existência de 17 variantes do gene *eae* partilhadas por estirpes EPEC e VTEC/EHEC humanas e de animais (Blanco *et al.*, 2004).

Muitas estirpes EPEC exibem um padrão característico de aderência, chamado *aderência localizada*, este fenómeno está associado à presença de um plasmídeo denominado factor de aderência de EPEC (EAF), que contém um grupo de genes que codificam para o sistema BFP *bundle forming pili* que aumenta a estabilização da aderência da bactéria. Este plasmídeo não é essencial para a formação da lesão AE, no entanto parece que a sua presença aumenta a eficiência da formação da lesão AE (Gunzburg *et al.*, 1995; Trabulsi *et al.*, 2002).

As estirpes que contêm este plasmídeo denominam-se EPEC típicas, enquanto que as EPEC atípicas não contêm o plasmídeo EAF (Trabulsi *et al.*, 2002; Kaper *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2006). As estirpes EPEC atípicas parecem ser menos virulentas do que as

EPEC típicas provavelmente pela falta do plasmídeo EAF contudo poderão conter outros factores de virulência que compensem a ausência do plasmídeo podendo por isso não ser menos virulentas (Trabulsi *et al.*, 2002). As estirpes típicas produzem apenas factores de virulência codificados na região LEE e no plasmídeo EAF, com a excepção da produção da toxina termo estável enteroagregativa (EAST1) pelos serótipos O55:H6 e O127:H6. A toxina EAST1 é frequentemente produzida por estirpes atípicas (Nataro e Kaper, 1998)

Estirpes típicas e atípicas apresentam outras diferenças entre elas, diferem nos padrões de aderência mediados por diferentes proteínas, revelam diferenças interessantes em relação à produção de variantes da intimina, na produção ou não do sistema BFP e na proximidade genética das estirpes atípicas ao grupo VTEC/ EHEC de estirpes de *E. coli* (Trabulsi *et al.*, 2002).

#### 1.3.2 Habitat natural e transmissão

A transmissão das estirpes EPEC ocorre via oral ou fecal, em produtos alimentares contaminados. Nataro e Kaper (1998) relatam o isolamento de estirpes EPEC em humanos, a partir de pó e aerossóis, sugerindo a sua potencial transmissão via aérea e consequente inalação. Pensa-se que os reservatórios de *E. coli* EPEC possam ser sintomático ou assintomático em crianças, e assintomático em adultos portadores, incluindo mães e pessoas que lidam com crianças afectando o intestino delgado (Nataro e Kaper 1998). Estirpes EPEC típicas não foram detectadas em animais sugerindo que o ser humano seja o seu reservatório natural, enquanto que as estirpes atípicas foram isoladas em variadas espécies de animais como gado bovino, em suínos, em leitões com diarreia em particular, alguns ruminantes como cabras saudáveis e cães. São necessários mais estudos sobre os serótipos de estirpes EPEC atípicas isolados em animais (Trabulsi *et al.*, 2002; Cortés *et al.*, 2005). Um estudo de Stephan *et al.* (2004) revela o isolamento pela primeira vez de um serótipo O157:H45 EPEC típica a partir de gado bovino associado a infecções em seres humanos.

### 1.3.3 Aspectos epidemiológicos

Estirpes EPEC típicas estão fortemente associadas a diarreias infantis em crianças com menos de 1 ano de idade, enquanto que nos adultos as infecções são raras. No passado, estirpes típicas EPEC tiveram forte prevalência em países industrializados da Europa e EUA, actualmente a sua presença é rara salvo em casos esporádicos. No Reino Unido estirpes EPEC típicas representam apenas 10% do total das estirpes EPEC (Nataro e Kaper, 1998; Stephan *et al.*, 2004). Nos países em desenvolvimento a situação é um pouco diferente, sendo a maior causa de diarreias infantis (Gunzburg *et al.*, 1995). Estudos efectuados no Brasil, México e África do Sul mostram que, 30 a 40% das diarreias infantis são atribuídas a estirpes EPEC (Nataro e Kaper, 1998; Vieira *et al.*, 2001; Trabulsi *et al.*, 2002). Nos animais, as estirpes EPEC também estão associadas a casos de diarreias no gado bovino, especialmente em bezerros e nos suínos (Oswald *et al.*, 2000).

## 1.4. ETEC - *E. coli* enterotoxigénica

### 1.4.1 Patogeneidade

As estirpes ETEC produzem as enterotoxinas termo lábil (LT) e termo estável (ST), podendo expressar só a LT ou só a ST ou ambas as toxinas. As toxinas LT dividem-se em dois grupos LT-I e LT-II, o grupo LT-I foi associado a patologias no homem e animais, enquanto que LT-II foi detectada em isolados de alguns animais e parece não haver nenhuma evidência de associações a patologias em seres humanos. A LT-I é uma toxina de 86 kDa de massa molecular, composta por uma subunidade A e cinco subunidades B dispostas em forma de anel sob a unidade A. As subunidades B intervêm na ligação da bactéria aos gangliosídeos da superfície das células epiteliais, e a subunidade A é responsável pela actividade enzimática da toxina.

As toxinas ST, termo estáveis ao contrário das LT, são toxinas de pequenas dimensões, contendo 18 aminoácidos onde seis são cisteínas que formam pontes de dissulfuretos promovendo a estabilidade das toxinas. Os genes que as codificam localizam-se predominantemente em plasmídeos. As toxinas ST compreendem duas classes, a STa e

STb, que diferem na estrutura e no mecanismo de acção. A toxina STa também chamada de ST-I é produzida por estirpes ETEC e por outras bactérias *Gram negativas* incluindo a *Yersinia enterocolitica* e *V. cholera*, enquanto que a toxina STb só é produzida por estirpes ETEC. Foi recentemente descrito que estirpes ETEC podem expressar o factor de virulência EAST1 em conjunto com a STa (Nataro e Kaper, 1998).

A toxina STa ou ST-I é constituída por um peptídeo de 18 aminoácidos com 2 kDa de massa molecular apresentando duas variantes, a ST suíno ou ST-Ia e a ST humana ou ST-Ib isoladas em suínos e em seres humanos, respectivamente.

A toxina STb é maioritariamente associada a estirpes de ETEC isoladas de suínos, embora estudo recentes apontem também para estirpes humanas que também expressam esta toxina. É uma proteína constituída por quarenta e oito aminoácidos com 5,1 kDa de massa molecular e a sua constituição não tem qualquer semelhança com a STa. Em contraste com a STa, a STb danifica o epitélio intestinal induzindo o atrofiamento parcial das microvilosidades que se projectam das células intestinais (Nataro e Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

#### 1.4.2 Factores de virulência

O mecanismo pelo qual as estirpes ETEC aderem e colonizam a mucosa intestinal tem sido alvo de estudos intensos. A aderência aos enterócitos é mediada por fímbrias superficiais também chamadas *pili*. A sua patogeneicidade é específica para cada organismo alvo, como tal, estirpes ETEC que expressem a adesina fimbrial K99 são patogénicas para gado bovino, ovino e suínos, enquanto que estirpes que expressem outras adesinas fimbriais tais como o K88, só têm capacidade de causar infecções em suínos (Nataro e Kaper, 1998). Outras adesinas fimbriais F41 e P987, foram associadas a diarreias ou doença dos edemas em suínos e ainda não foram detectados em estirpes ETEC humanas (Blanco *et al.*, 1997; Nataro e Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

#### 1.4.3 Aspectos epidemiológicos

Estirpes ETEC estão associadas a dois importantes síndromas clínicos: diarreia infantil nos países em desenvolvimento com causa de mortes e a chamada diarreia do viajante

(Erume *et al.*, 2008). Várias Investigações epidemiológicas revelam que água contaminada e alimentos poderão ser os veículos mais comuns para desenvolver infecções por estirpes ETEC, sendo a dose requerida para provocar infecção relativamente alta. Nos países em desenvolvimento, amostras fecais, água contaminada e produtos alimentares podem ser os principais factores que justifiquem a elevada incidência de infecções por ETEC. Estirpes de ETEC são também os predominantes agentes etiológicos da diarreia do viajante em adultos oriundos de países desenvolvidos visitando regiões onde estas infecções são endémicas, ocorrendo de um modo geral em climas quentes e húmidos de países em desenvolvimento (Nataro e Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004). Estirpes ETEC são também uma das maiores causas de diarreias em animais, especialmente em suínos, afectando de uma forma significativa a produção animal (Erume *et al.*, 2008).

#### 1.5. VTEC/EHEC- *E. coli* verotoxigénica/*E. coli* enterohemorrágica

##### 1.5.1 História e definições

Entre as várias categorias de estirpes patogénicas de *E. coli*, as estirpes verotoxigénicas ou shigatoxigénicas e as enterohemorrágicas são certamente as de maior interesse científico. Até à década de oitenta do século XX, a comunidade científica atribuiu-lhes pouco significado. Essa postura alterou-se drasticamente, em poucos anos, comparando com outras estirpes patogénicas de *E. coli* baseada sem dúvida, na sua elevada patogeneicidade com associações irrefutáveis a patologias graves em seres humanos (Mainil e Daube 2005; Karmali *et al.*, 2009).

A história das VTEC segue duas linhas de estudos convergentes. A primeira linha surge em 1977 quando Konowalchuk descreveu a capacidade de certas estirpes de *E. coli* de produzirem toxinas que causavam efeito citopático irreversível em células Vero em cultura, surgindo o termo verotoxina (Bettelheim e Beutin, 2003). Em 1983 foi reportado que, várias estirpes de *E. coli* isoladas de humanos tinham a capacidade de produzir o mesmo efeito letal em células HeLa. Assim como a toxina de *Shigella dysenteriae* tipo I (Stx), a toxina de *E. coli* inibia a síntese proteica em células HeLa, por

estas características foi atribuído o nome de *Shiga-like*. A terminologia VTEC/ verotoxina passou a ser usada pela comunidade científica inglesa e canadiana, enquanto que a comunidade norte americana adoptou o termo de SLTEC/ toxina *Shiga-like* (Mainil, 1999). Em 1996 foi proposto o termo de STEC-shigatoxigénica, *E. coli* produtora da toxina Shiga (Stx) devido ao alto grau de homologia estrutural e funcional da toxina de *E. coli* com a toxina de *Shigella dysenterae* tipo I.

A segunda linha de estudos teve início em 1983, nos EUA, com a descrição de que um raro serótipo de *E. coli* O157:H7 seria responsável por casos de colite hemorrágica (CH) associado ao consumo de hambúrgueres mal passados contaminados. O serótipo O157:H7 passou então a ser associado a um amplo espectro de patologias em seres humanos, que inclui desde diarreias leves à colite hemorrágica, ao Síndrome Hemolítico Urémica (HUS) cuja possível sequela mais grave é a falência renal e a Trombocitopenia Trombótica Púrpura (TTP) com possível envolvimento no sistema nervoso central (Nataro e Kaper, 1998; Paton e Paton 1998b; Mainil e Daube, 2005). Como este serótipo foi inicialmente associado à colite hemorrágica, adquiriu a definição clínica de *E. coli* enterohemorrágica EHEC. Progressivamente, outros serótipos foram associados também a CH, HUS e TTP como O26:H11, O103:H2, O111:H<sup>-</sup> e O145:H<sup>-</sup> implicando o alargamento do grupo EHEC. Originalmente, o serogrupo EHEC incluía todas as estirpes de *E. coli* isoladas de seres humanos e animais, que produziam as toxinas Vtx, que causavam a lesão AE e que continham um plasmídeo de 60 MDa, o pEHECa. Actualmente, mais de 50 serótipos de VTEC foram também classificados como EHEC devido à sua associações a infecções clínicas causadas normalmente pelo serótipo O157:H7 (Meng *et al.*, 1998). Actualmente, não há uma definição clara para o grupo EHEC, excepto que todas as estirpes enterohemorrágicas são consideradas extremamente patogénicas para os seres humanos. Para muitos autores este grupo é um subgrupo de VTEC ou STEC, enquanto que outros consideram as EHEC um outro serogrupo de *E. coli* (Nataro e Kaper 1998; Kaper *et al.*, 2004; O'Sullivan *et al.*, 2007; Karmali *et al.*, 2009).

A maioria dos casos registados de surtos de infeções a nível mundial é causada por estirpes do serótipo O157, mas recentemente, assiste-se particularmente na Europa a um aumento de surtos infecciosos provocados por outros serótipos dos serogrupos O26, O111, O103 e O145, e que são reportados frequentemente como estirpes VTEC não-O157 (EFSA, 2007; Karmali *et al.*, 2009), mas também como EHEC não-O157 por Mainil e Daube (2004).

VTEC e STEC são termos equivalentes, ambos referem estirpes que produzem uma ou duas toxinas VTx/STx, não sendo claro que a posse dos genes que codificam para estas toxinas lhes confira patogeneidade na ausência de outros factores de virulência (Nataro e Kaper 1998). Acredita-se que nem todas as estirpes VTEC sejam patogénicas, enquanto que todas as estirpes EHEC são consideradas virulentas. Vários autores referem-se às estirpes VTEC como aquelas que apenas produzem VTx, ambas ou uma só, que não causam a lesão AE e/ou não possuam o plasmídeo de 60 MDa (Nataro e Kaper, 1998; Mainil e Daube, 2005; O'Sullivan *et al.*, 2007). No presente documento ir-se-á adoptar a terminologia de VTEC com as respectivas toxinas VTx.

Na tabela 1.1 indicam-se alguns exemplos de serótipos de *E. coli* pertencentes aos patótipos EHEC e VTEC isolados de humanos e animais segundo estudos de Meng *et al.* (1998) e Mainil e Daube (2004). Alguns serótipos de *E. coli* apresentam características diferentes em relação à mobilidade. Estirpes sem flagelos, logo com ausência de mobilidade, representam-se com H<sup>-</sup> ou NM por exemplo, *E. coli* O157/H<sup>-</sup> ou O157/NM (Feng *et al.*, 1996).

Tabela 1.1: Alguns exemplos de serótipos de *E. coli* distribuídos por serogrupos segundo as suas propriedades. Adaptada de Meng *et al.* (1998), Beutin *et al.* (2007) e de Mainil e Daube (2004).

Patótipos de <i>E. coli</i>	Serótipos (móvel/não móvel)
EHEC O157	O157:H7/H <sup>-</sup>
EHEC não O157	O5:H <sup>-</sup> , O26:H11/H <sup>-</sup> , O145:H <sup>-</sup> , O111:H <sup>-</sup> , O125:H <sup>-</sup> , O50:H7, O153:H2, O104:H <sup>-</sup> , O45:H2, O103:H2, O118:H6
VTEC	O91:H2/H <sup>-</sup> , O118:H16/H <sup>-</sup> , O88:H49, O46:H38, O22:H8, O29:H19/H <sup>-</sup> , O91:H21, O113:H21, O174:H2/21

### 1.5.2. Patogeneidade

#### 1.5.2.1 Mecanismo de patogeneidade

O mecanismo de patogeneidade é um processo de múltiplos passos envolvendo um sistema complexo de interações entre a bactéria e as células hospedeiras. Estima-se que a dose de infecção das estirpes EHEC seja na ordem de 10 a 100 ufc considerada extremamente baixa quando comparadas com estirpes ETEC ou EPEC em que são necessários de  $10^8$  a  $10^9$  ufc (Mellies *et al.*, 2007). As estirpes infectam o intestino grosso infligindo danos no cólon resultando diarreia com sangue podendo evoluir para a HUS e TTP. A sua estratégia de patogeneidade consiste na colonização da mucosa intestinal e na produção das verotoxinas que atacam as células alvo nos rins, sistema vascular e cólon. O processo de adesão é heterogêneo reflectindo a sua complexidade, algumas estirpes aderem de um modo difuso e outras formam grupos de microcolónias em locais específicos da superfície epitelial. O fenótipo de aderência melhor descrito e característico das EHEC é a produção da lesão AE codificada por genes localizados numa ilha de patogeneidade, LEE, sendo a intimina responsável pela aderência aos enterócitos. Esta propriedade é exibida também por estirpes EPEC, como mencionado acima, mas, foram reportadas diferenças entre as duas categorias de *E. coli* ao nível da LEE todavia, a organização interna dos genes na LEE é conservada (Nataro e Kaper, 1998; Mainil e Daube, 2005). Não há dúvida da forte associação entre a intimina e a capacidade de estirpes EHEC causarem patologias como CH e HUS, no entanto, estirpes EHEC isoladas de pacientes com HUS, não possuíam o gene *eaeA*, indicando que esta proteína poderá não ser essencial para a virulência (Nataro e Kaper, 1998).

#### 1.5.2.2 Verotoxinas/Shigatoxinas

As toxinas VTx ou STx de *E. coli* são potentes citotoxinas, cuja acção pode levar a lesões graves com sequelas e mesmo até à morte de pacientes infectados. Dividem-se em dois grupos: VT<sub>1</sub> com alto grau de homologia com STx de *S. dysenteriae* tipo1, e VT<sub>2</sub> pouco relacionada com STx de *S. dysenteriae* tipo1. A toxina VT<sub>2</sub> apresenta várias variantes biológicas que diferem na toxicidade e sequências genéticas: VT<sub>2</sub>, VT<sub>2c</sub>, VT<sub>2v</sub>, VT<sub>2d</sub> e VT<sub>2f</sub>



isoladas de estirpes humanas e VT<sub>2e</sub> isolada de suínos (Nataro e Kaper, 1998; Paton e Paton, 1998b; Bettelheim e Beutin, 2003). Um trabalho de Zhang *et al.* (2002) descreveu a identificação e caracterização de uma estirpe variante de VT<sub>1</sub> denominada de VT<sub>1c</sub> de origem humana, revelando diferenças marcantes relativamente ao gene codificador para VT<sub>1</sub>. As toxinas Vtx são proteínas do tipo AB<sub>5</sub> formadas por duas subunidades de polipeptídeos, a subunidade A com 33 kDa, a parte biologicamente activa, que está ligada a cinco subunidades idênticas B de 7,5 kDa e que estabelece a ligação com os receptores específicos da célula hospedeira. O receptor específico presente na superfície da célula hospedeira é o composto glicolipídico Gb3 para VT<sub>1</sub> e VT<sub>2</sub> e GB4 para VT<sub>2e</sub>. Após a aderência, a toxina sofre endocitose por meio de depressões da membrana citoplasmática da célula eucariota, e é transportada pelo aparelho de Golgi até ao retículo endoplasmático. A acção da subunidade A leva à inibição da síntese proteica conduzindo à morte celular de células de endotélio vascular, de células epiteliais da mucosa intestinal, do epitélio renal, ou outras células que possuam o receptor Gb3 ou Gb4 (Nataro Kaper, 1998; Paton e Paton, 1998b). As VTx podem causar danos e acumulação de fluidos no intestino, mediante um mecanismo de destruição das pontas de absorção das microvilosidades das células do epitélio intestinal. A danificação do epitélio intestinal pelas VTx pode também ajudar a translocação da toxina para a corrente sanguínea. Esta hipótese é suportada pelo facto de que pacientes com diarreia com sangue serem mais propensos a desenvolver HUS do que aqueles com diarreia leve (Law, 2000). Dados epidemiológicos sugerem que a toxina VT<sub>2</sub> é mais relevante do que VT<sub>1</sub> no desenvolvimento de HUS, estirpes que expressem só VT<sub>2</sub> têm uma associação mais forte ao desenvolvimento de HUS do que estirpes que expressem só VT<sub>1</sub> ou, curiosamente, ambas as toxinas (Nataro e Kaper, 1998).

Em *E. coli*, os genes *vtx* que codificam para as toxinas VTx estão localizados em bacteriófagos que, de acordo com estudos recentes poderão não ser só vectores passivos mas elementos genéticos cujas características poderão influenciar o mecanismo de patogeneicidade (Paton e Paton, 1998b; Wasteson, 2001; Wetzel e LeJeune, 2007).

Acredita-se que a aquisição de genes de virulência por estirpes de *E. coli*, contribui para o evoluir da patogeneidade. A produção de toxinas parece não ser o único aspecto relevante para uma estirpe adquirir virulência (Welinder-Olsson e Kaijser, 2005; Chapman *et al.*, 2006).

#### 1.5.3. Habitat natural e transmissão

Está bem documentado que o gado bovino é o principal reservatório natural das estirpes VTEC/EHEC e que têm sido implicadas em patologias graves em seres humanos em particular o serótipo EHEC O157:H7 que tem sido objecto de intensivos estudos (Avery *et al.*, 2005; Ravva *et al.*, 2006; Gunn *et al.*, 2007; Karmali, 2009). O gado bovino saudável é portador assintomático de estirpes VTEC/EHEC, que são transitórias na flora intestinal. A sua presença parece ser influenciada por vários factores que incluem a idade dos animais, dieta, densidade populacional, situação geográfica e sazonalidade, contudo, alguns serótipos como O157:H7 têm a capacidade de causar diarreias no gado especialmente nos bezerros com menos de 1 ano de idade (Nataro e Kaper, 1998; Paton e Paton, 1998b). Este grupo de estirpes também tem sido frequentemente isolado a partir de outras espécies de ruminantes como gado ovino e caprino, suínos, animais selvagens e domésticos e também em peixes e marisco. Um estudo no Japão demonstra a transmissão do serótipo O157:H7 por moscas comuns e a sua detecção em superfícies de materiais inertes (Jaeger *et al.*, 2000).

As estirpes VTEC/EHEC podem potencialmente ser transmitidas ao homem por várias vias, uma diz respeito à cadeia alimentar que envolve o consumo de produtos alimentares de origem animal, nomeadamente carne mal passada ou contaminada, produtos lácteos com pasteurizações deficientes e refeições prontas de carne possivelmente contaminadas durante e/ou após o processamento. Há registos do aumento de transmissão veiculada por outros tipo de produtos, alimentos fermentados, alimentos não cozinhados como frutas e legumes cujas culturas foram fertilizadas com estrumes e/ou lamas contaminadas ou com características inadequadas para o efeito provenientes de explorações agropecuárias (Avery *et al.*, 2005). A água é um veículo eficiente para a disseminação de estirpes VTEC/EHEC, tendo maior incidência em zonas

rurais por intermédio do consumo de águas contaminadas e da irrigação de culturas com águas contaminadas com dejectos dos animais (Jaeger *et al.*, 2000; EFSA, 2007).

O contacto directo ou indirecto com animais, designadamente, no manuseamento de animais no abate, processamento das carcaças (Karmali *et al.*, 2009; Breum e Boel, 2010) e contacto com as fezes misturadas com materiais de camas e outros, se as condições de higiene não forem adequadas pode resultar na transmissão de estirpes VTEC/EHEC. Outra via de transmissão importante é o contágio *pessoa-pessoa* através da contaminação fecal-oral entre famílias, nas escolas e noutras instituições (EFSA, 2007).

Os suínos não são considerados uma importante via de transmissão de estirpes VTEC implicadas em patologias nos humanos, por outro lado, a Doença dos Edemas (DE) em leitões é uma patologia fatal e frequentemente associada a vários serótipos VTEC como O138:K81, O139:K82, e O141:K85 mas não têm associações a infecções em seres humanos (Paton e Paton, 1998b).

#### 1.5.4. Aspectos epidemiológicos

A partir da década de noventa do século passado, um vasto leque de estudos comprovaram a grande incidência de surtos e episódios esporádicos envolvendo as estirpes VTEC/EHEC a nível mundial (Chapman, 1995; Wallace *et al.*, 1997; Lahti *et al.*, 2001; Foster *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2009).

Clinicamente, 50% dos pacientes com HUS desenvolvem falência renal enquanto que a taxa de mortalidade através de infecções com *E. coli* O157 a nível mundial, é aproximadamente 5% (Avery *et al.*, 2005). Actualmente, segundo um estudo de Ravva *et al.* (2006), estirpes *E. coli* O157 são responsáveis por uma taxa de 8 infecções por 100 000 habitantes em vários países como o Japão, Canadá e Reino Unido, e que as taxas de infecções nestes países são cinco vezes mais altas comparando com os países da América do Sul. Em contraste, um estudo de Blanco *et al.* (2004) indica a Argentina como um dos países com maior índice de infecção por HUS no mundo, cerca de 300/400 casos por ano, registando também o consumo elevado de carne bovina de 60Kg por pessoa e por ano.

Nos EUA, a implementação de um sistema de controlo pelo Centro para a Prevenção e Controlo de Doenças (CDC) reforçou significativamente a capacidade da recolha anual de dados relativos a surtos infecciosos de vários patogénicos incluindo o serótipo O157:H7. Registou-se um aumento significativo de casos confirmados durante a década de noventa associados ao serótipo O157:H7. A maioria destas patologias segundo o CDC resultou do consumo de carne bovina contaminada, consumo de vegetais crus em saladas, água contaminada e transmissão “pessoa a pessoa” (Jaeger *et al.*, 2000; Mukherjee *et al.*, 2004; Mukherjee *et al.*, 2006). Na Inglaterra, País de Gales e Escócia regista-se uma grande incidência de surtos, mais associados a zonas rurais e com ligação directa a espalhamentos de estrumes contaminados em culturas (Duffy, 2003; Guane e Holley, 2003; Karmali, 2004; Gunn *et al.*, 2007).

Além do serótipo EHEC O157:H7, outros serótipos não-O157 têm sido também implicados neste tipo de patologias, incluindo a HUS, em seres humanos (Nataro e Kaper, 1998; Jaeger, *et al.*, 2000). Estudos recentes revelam o seu incremento em detrimento do serótipo O157:H7 também com uma distribuição global com destaque para o continente europeu onde se regista o maior aumento (Nataro e Kaper, 1998; Blanco *et al.*, 2004; Karmali, 2004; Zweifel *et al.*, 2005; Mukherjee *et al.*, 2006).

A prevenção e o controlo deste tipo de infecções requerem, além de intensas investigações, o estabelecimento de estratégias únicas a nível internacional. De modo a obter dos Estados Membros (EM) da EU as informações necessárias que permitissem avaliar as tendências e origens deste tipo de zoonose, a EU, através da Directiva 2003/99/CE propôs medidas que impõem aos países a investigação epidemiológica dos focos dos agentes patogénicos de origem alimentar.

Os dados recolhidos em cada país são remetidos pela Comissão Europeia para a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) a quem é atribuída a tarefa de os examinar, tratar e publicitar. A EFSA publicou em 2006, o relatório *The Community Summary Report*, com dados referentes ao ano 2005 apresentados pelos diferentes países da EU. Em 2005, um total de 3314 casos de infecções em humanos por estirpes

VTEC nos países da EM foram reportados segundo o relatório *The Community Summary Report*.

Na tabela seguinte apresenta-se os dados referentes aos números de casos de infeções por VTEC/EHEC em humanos, nos estados membros da UE em 2005. A Tabela 1.2 expressa de um modo claro as diferenças marcantes entre os países em relação ao número de infeções. Registam-se os casos de Inglaterra e País de Gales, Escócia e Suécia com elevados casos de infeções, contrastando com a Hungria, Portugal, Malta e Espanha. Evidencia também a percentagem dos casos reportados a estirpes não O157, que em vários países é superior à percentagem das estirpes O157, como Itália, Dinamarca, Malta, Alemanha e Noruega. No caso de Portugal, os serótipos das estirpes responsáveis pelos 15 casos reportados não foram caracterizados.

Tabela 1.2: Números de casos de infeções por VTEC/EHEC relativo a estirpes do serótipo O157 e não O157, e número de casos de HUS em seres humanos em 2005. Adaptada de EFSA (2007).

País	Número de casos	(%) Casos		Casos de HUS <sup>(1)</sup>
		O157	Não O157	
Áustria	59	46	54	9
Bélgica	52	60	40	20
Dinamarca	156	17	72	4
Inglaterra e Gales	954	100		ND <sup>(2)</sup>
Finlândia	21	71	29	ND
França	108	68	19	20
Alemanha	759	10	64	8
Hungria	5	60	40	0
Irlanda	125	86	14	17
Itália	22	14	82	19
Luxemburgo	11	18	82	ND
Malta	5	100		0
Holanda	54	100		4
Noruega	18	39	50	1
Portugal	15	ND	ND	ND
Escócia	176	94	6	ND
Espanha	15	100		1
Suécia	364	52	13	11

<sup>(1)</sup> Diagnóstico clínico de HUS, alguns casos foram reportados sem isolamento ou confirmação. <sup>(2)</sup> Não determinado.

## 1.6. EIEC-*E. coli* enteroinvasiva, EAEC-*E. coli* enteroagregativa, DAEC-*E. coli* com aderência difusa

### 1.6.1 Patogeneidade

Estirpes de *E. coli* EIEC são, na sua patogeneidade, bioquímica e geneticamente muito semelhantes à espécie *Shigella* spp., sendo difícil distinguir estas estirpes da *Shigella* e de outras estirpes de *E. coli*. Diversos estudos sugerem que o mecanismo de patogeneidade possa ser virtualmente idêntico ao da *Shigella*. O modelo proposto compreende a invasão pela bactéria das células epiteliais, lise do vacúolo, multiplicação intracelular, movimento pelo citoplasma e extensão para a célula epitelial adjacente (Nataro e Kaper, 1998). Os genes envolvidos na virulência de EIEC estão presentes num plasmídeo de grandes dimensões com estrutura em mosaico (Kaper *et al.*, 2004). O gene *ial* contido no plasmídeo pInV é uma característica genética específica para a identificação de estirpes EIEC (Nataro e Kaper, 1998).

As estirpes EAEC aderem a células HEp-2 (células de testes) sob a forma de um padrão auto-agregativo, no qual as bactérias aderem umas às outras numa configuração do género *tijolos sobrepostos*. Têm a capacidade de produzirem várias toxinas, como a enterotoxina oligomérica denominada de ShET1 e a EAST1, o gene que codifica para esta toxina (*astA*) também pode ser detectado noutras estirpes de *E. coli* (Kaper *et al.*, 2004).

As estirpes de *E. coli* DAEC são definidas pela presença de um padrão difuso de aderência a células HEp-2. Induzem um efeito citopático caracterizado pelo desenvolvimento de longas extensões celulares que envolvem as bactérias aderentes às células epiteliais, esta característica requer a ligação da proteína DAF e da adesina F1845 (Kaper *et al.*, 2004).

### 1.6.2 Aspectos epidemiológicos

Estudos epidemiológicos descrevem casos esporádicos em seres humanos de infecções por EIEC, que muitas vezes podem ser confundidas com infecções causadas por *Shigella* spp., tendo origem em águas e produtos alimentares contaminados. Os casos

documentados ocorrem em regiões onde ocorre presença de *Shigella* spp. Vários estudos suportam a associação de estirpes EAEC a diarreias muito persistentes com uma duração de mais de 14 dias em adultos e crianças. A sua distribuição parece incidir mais nos países em desenvolvimento. Estirpes DAEC têm sido implicadas em surtos de diarreia em crianças com mais de um ano de idade, aumentando a sua frequência em crianças com 4 e 5 anos. O modo de aquisição das infecções por DAEC permanece desconhecido (Nataro e Kaper, 1998).

#### 1.7. Toxinas hemolíticas de *E. coli*

As toxinas hemolíticas são exotoxinas e produzidas por numerosas bactérias *Gram positivas* e *Gram negativas*. Representam um grupo de toxinas membrano-ativas e são frequentemente citolíticas induzindo a lise dos eritrócitos e de outras células tais como linfócitos, granulócitos, células endoteliais e células renais tubulares (Schmidt *et al.*, 1995). A lise resulta da oxidação do ferro da hemoglobina a metahemoglobina presente nos eritrócitos. Estas toxinas pertencem a um grupo de proteínas formadoras de poros (*pore forming protein*) e constituem a família das proteínas RTX (*repeats in toxin*). Esta designação refere-se à presença de uma região de homologia constituída por cópias de uma sequência de nove aminoácidos próxima do C-terminal das proteínas. A sequência das repetições das unidades é representada por L-XG-G-X-G-N-D-X (Boehm *et al.*, 1990). A capacidade de várias estirpes de *E. coli* de provocar a lise de eritrócitos de diferentes espécies de mamíferos (hemolisinas) foi descrita por Kaiser em 1903 (Schmidt e Benz 2003). Vários tipos de hemolisinas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e enterohemolisina Ehx) são produzidas por *E. coli* EIEC, UPEC, ETEC e VTEC/EHEC de diversas origens, humanas e animais (Mainil e Daube, 2005).

Presentemente, a mais bem caracterizada ao nível genético, bioquímico e funcional é a  $\alpha$ -hemolisina (Hly). Segundo diversos estudos, o íon cálcio é essencial para a sua activação, estabilização e para a ligação da toxina às membranas das células eucariotas (Beutin, 1991). É uma das poucas proteínas de *E. coli* a ser excretada para o meio de cultura, expressa-se na fase exponencial do crescimento após 3-4h de incubação a 37°C,

em agar de sangue com eritrócitos de carneiro lavados ou não, revelando uma hemólise dos eritrócitos com halos claros envolvendo colónias de coloração verde-cinza (Beutin, 1991; Beutin, *et al.*, 1996). A  $\alpha$ -hemolisina tem aproximadamente 110 kDa de massa molecular e é codificada pelo gene *hly A* (Schmidt *et al.*, 1995). Nos animais, a expressão de  $\alpha$ -hemolisina ocorre em estirpes suínas e caninas de ETEC, que transportam plasmídeos que codificam separadamente os genes para alfa hemolisina e para as clássicas enterotoxinas. Em estirpes suínas VTEC/STEC os genes codificadores de  $\alpha$ -hemolisina estão localizados também num plasmídeo que, frequentemente transporta outros genes codificadores de K88, a adesina fimbrial F18 e/ou as enterotoxinas (Mainil, 1999).

A  $\beta$ -hemolisina é uma toxina similar na sua acção quando comparada com a  $\alpha$ -hemolisina, no entanto não é secretada pela célula permanecendo ligada à membrana celular, não se dissocia, e aparentemente a sua actividade depende do metabolismo celular e é activa na fase exponencial do crescimento (Chat *et al.*, 1998). A sua expressão é observada em placas de agar de sangue, com lise celular após 24h de incubação a 37°C, também chamada de *hemolisina total* devido à lise completa do agar com halos largos em redor das colónias claras e brilhantes. É produzida por estirpes de *E. coli* UPEC e ETEC frequentemente isoladas em humanos e em animais tais como suínos, ovinos, suínos com DE, e é o agente etiológico bacteriano da diarreia mais comum em leitões neonatais e no desmame (Beutin 1991; Bischoff *et al.*, 2000). A associação da  $\beta$ -hemolisina com outros factores de virulência de *E. coli* ainda não foi muito explorada. Em 1988, Beutin *et al.* descreveram outro tipo de hemolisina que foi denominada enterohemolisina (Ehly ou Ehx) pelo facto de estar associada grupo de *E. coli* VTEC e EHEC. Ehx pertence à família das RTX, é uma proteína monomérica, formadora de poros que se insere na membrana citoplasmática das células eucariotas, tendo o gene estrutural *ehxA* 60% de homologia com *hlyA* gene codificador de Hly (Law, 2000; Mainil e Daube 2005). É exportada por um sistema de secreção tipo I mas permanece ligada à bactéria, em contraste com  $\alpha$ -Hly, provavelmente em consequência de uma mutação



ocorrida nos genes que codificam para o sistema de transporte. Esta toxina difere da  $\alpha$ -hemolisina, ao nível genético, imunológico e expressão da sua actividade.

A toxina Ehx é codificada por quatro genes (*ehxC*, *ehxA*, *ehxB* e *ehxD*) localizados no plasmídeo pEHEC. Este fenómeno enterohemolítico não é característico de todas as estirpes VTEC/EHEC enquanto que a estirpe O157:H7 é enterohemolítica, a estirpe O157:H<sup>-</sup> não o é (Schmidt e Benz, 2003). A incidência de EHEC Hly em estirpes de *E. coli* produtoras de verotoxinas é muito elevada e estudos realizados com uma sonda de hibridação CVD419 revelaram também uma forte ligação com o gene *eae* (Schmidt *et al.*, 1995; Gyles *et al.*, 1998; Law, 2000). Em contraste com a  $\alpha$ -hemolisina, o padrão hemolítico da Ehx é caracterizado por pequenas zonas turvas de hemólise que ocorrem depois de 18-24 h de incubação a 37°C, no final da fase exponencial do crescimento bacteriano, e pode ser detectado apenas em agar de sangue preparado com sangue desfinibrado de carneiro lavado em tampão fosfato (Schmidt *et al.*, 1996).

O fenómeno enterohemolítico foi observado em estirpes isoladas de gado bovino, ovino, suíno, animais domésticos saudáveis e em estirpes humanas sem diferenças aparentes entre elas (Beutin *et al.*, 1995; Cookson *et al.*, 2007).

Apesar de frequentemente estar associada a estirpes implicadas em patologias graves, a Ehx não é essencial para o desenvolvimento de HUS e CH e o seu envolvimento em infecções humanas não está esclarecido, supondo-se que terá maior relevância em infecções em animais sendo de qualquer forma um marcador epidemiológico para estirpes VTEC e EHEC de *E. coli* (Law, 2000; Cookson *et al.*, 2007).

## 1.8. Métodos de Detecção

### 1.8.1 Métodos baseados em características fenotípicas

Existem vários métodos disponíveis para a caracterização de estirpes de *E. coli* e que incluem os ensaios de citotoxicidade, ensaios imunológicos e serotipagem (O'Sullivan *et al.*, 2007).

Os ensaios de citotoxicidade são dirigidos para detectar a presumível produção de verotoxinas e são realizados em células Vero (Paton e Paton, 1998a). Os métodos

imunológicos compreendem várias técnicas desenvolvidas ao longo dos anos dirigidas para a detecção de VTx e incluem ensaios imunoenzimáticos, serotipagem e separação imunomagnética (IMS). Muitos ensaios imunológicos estão disponíveis em *kits* prontos a usar que é uma vantagem para as análises de rotina no laboratório (Bettelheim e Beutin, 2003; Beutin *et al.*, 2007). A metodologia da separação imunomagnética (IMS) envolve a recuperação das células alvo a partir do meio de enriquecimento usando esferas paramagnéticas. A ISO 16654 direccionada para a detecção de O157 contempla o método IMS a ser utilizado antes do isolamento no meio de cultura, enquanto não for estabelecido um protocolo standard para as outras VTEC, é um método bastante utilizado para a identificação de serogrupos específicos (O'Sullivan *et al.*, 2007). A serotipagem é baseada na utilização de antisoros específicos e detecção dos antígenos somáticos *O* e flagelares *H* expressos pela bactéria. A reacção é denominada de aglutinação, geralmente formam-se agregados que podem ser visualizados facilmente. Actualmente estão disponíveis comercialmente o total de 181 antígenos *O* e 53 antígenos *H*. Estirpes não móveis requerem testes suplementares à mobilidade. O teste mais amplamente usado é o ELISA (Nataro e Kaper, 1998).

#### 1.8.2 Métodos moleculares

As sondas de hibridação, a *Polymerase Chain Reaction (PCR)* e sistemas de tipagem são métodos moleculares utilizados na caracterização de estirpes de *E. coli*. As sondas de hibridação são cadeias simples de DNA ou RNA que, numa reacção de hibridação molecular se ligam às sequências que lhes são complementares. Podem conter centenas de nucleótidos mas normalmente são limitadas a 15-20 nucleótidos (sondas oligonucleotídicas). A detecção da hibridação com o DNA alvo requer a marcação das sondas, que pode ser feita com isótopos radioactivos ou fluorocromos. A detecção do sinal pode ser feita de várias formas, por exemplo por reacção imunológica (Paton e Paton, 1998a; Taveira, 2000).

A PCR é o método de amplificação de genes *in vitro*, que foi desenvolvido em 1983 por Kary Mullis e é o método de amplificação dos ácidos nucleicos melhor desenvolvido e de utilização mais generalizada (Taveira, 2000).

Sistemas de tipagem são sistemas que permitem analisar, simultaneamente, a informação genética de um microrganismo e comparar essa informação com outros microrganismos. Inserem-se aqui, a tipagem de bacteriófagos, os métodos de DNA *fingerprinting* e análise dos perfis de restrição do DNA cromossómico. A análise dos perfis do DNA cromossómico ou análise dos polimorfismos de restrição (RFLPs) envolve a digestão do DNA cromossómico com enzimas de restrição, a separação dos fragmentos em gel de agarose e hibridação dos fragmentos com sondas. Para separar fragmentos de DNA de grande massa molecular recorre-se ao uso da electroforese em campo pulsado (pulse field gel electrophoresis - PFGE) (Nataro e Kaper, 1998).

#### 1.9. Objectivo

O objectivo deste estudo foi pesquisar a presença de factores de virulência em estirpes de *E. coli* isoladas de amostras oriundas de resíduos de produção animal de diferentes origens e constituição, provenientes de explorações agro-pecuárias.

## CAPÍTULO 2

---

### MATERIAS E MÉTODOS

---

#### 2.1 Parte experimental

A parte experimental deste projecto foi desenvolvida entre Março de 2009 e Julho de 2010, tendo-se realizado a recolha das amostras no período compreendido entre Março e Junho de 2009.

##### 2.1.1 Selecção das explorações agropecuárias

Foram seleccionadas oito explorações agro-pecuárias com base em factores como a situação geográfica, os processos de tratamento que praticam e a origem dos resíduos orgânicos. Seis das oitos explorações já tinham sido visitadas no âmbito do projecto Valorização Agrícola das lamas de ETARs de Agro-Indústrias através da Compostagem (AGRO 70/2002) (Silveira *et al.*, 2005) e uma sétima visitada no âmbito do projecto Compostagem de Lamas de Suiniculturas (2008/9) (Silveira *et al.*, 2009). As amostras de resíduos orgânicos recolhidas distribuem-se do seguinte modo: seis são provenientes de suiniculturas, duas de pecuárias e uma de abate e processamento de carnes de aves e situam-se na Região de Lisboa e Vale do Tejo. As amostras provenientes das suiniculturas foram recolhidas após a separação de sólidos (fracção sólida). Note-se que numa das suiniculturas visitadas, o efluente foi sujeito a um tratamento por digestão anaeróbia antes da separação de sólidos. As amostras de estrume foram recolhidas em diversos locais de um dos parques das explorações, e a amostra da indústria de abate e processamento de carne avícola, foi recolhida na ETAR após o tratamento biológico.

#### 2.2. Métodos

Para a caracterização físico-química e microbiológica de cada amostra foi definida uma metodologia conforme se apresenta esquematicamente na Figura 2.1.

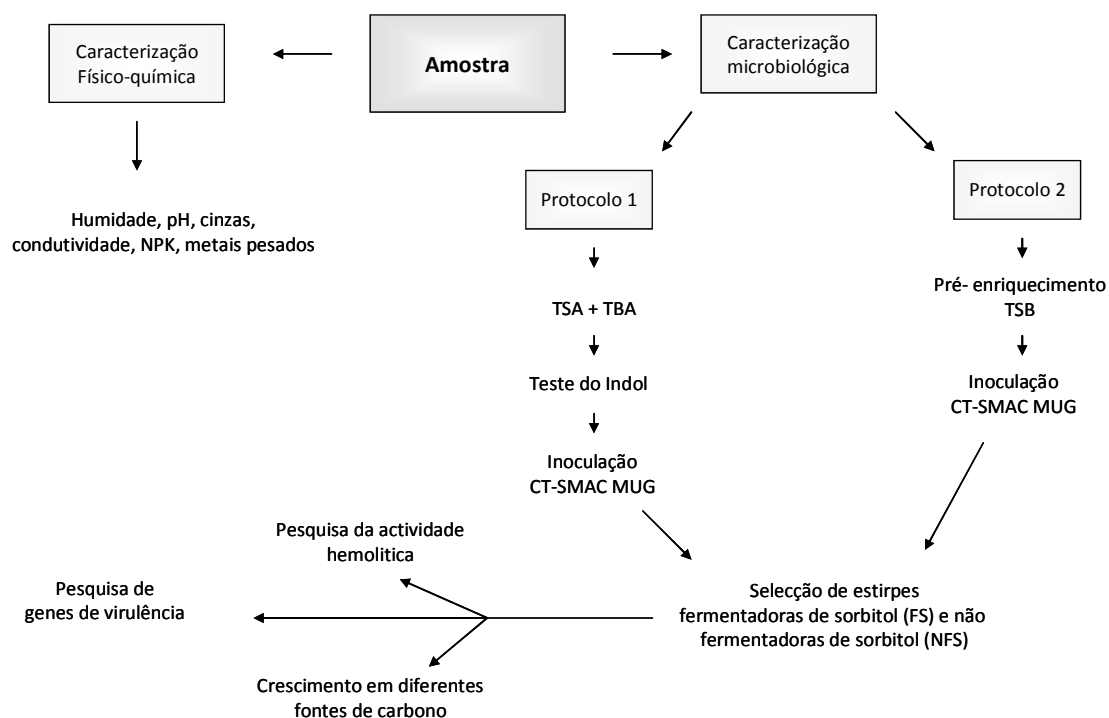


Figura 2.1: Representação esquemática da metodologia para a caracterização físico-química e microbiológica de cada amostra em estudo.

### 2.2.1 Métodos analíticos para a caracterização físico-química

Cada amostra fresca foi bem misturada para promover uma boa homogeneização; Determinou-se o pH e a condutividade da amostra fresca em suspensão aquosa 1:5 (p/v). Uma fracção foi seca a peso constante na estufa a  $105\pm 2^{\circ}\text{C}$  para determinação da humidade. Após homogeneização da amostra seca retirou-se uma sub amostra que foi triturada (triturador Retsch®) com crivo de granulometria de 1 mm para determinação de cinzas por combustão da amostra durante duas horas a  $550\pm 20^{\circ}\text{C}$  e para as análises de NPK e metais pesados (crómio, cádmio, cobre, chumbo, níquel e zinco).

### 2.2.2. Macronutrientes NPK e metais pesados

Foi determinado o azoto orgânico pelo método de mineralização da amostra com ácido sulfúrico concentrado na presença de um catalisador, o selénio. O teor de fósforo foi determinado por digestão a quente com água-régia, seguido de doseamento pelo

método do ácido vanadomolibdofosfórico. O potássio foi determinado por digestão a quente com água-régia, seguido de quantificação por plasma indutivamente acoplado a espectrometria de absorção atómica (ICP-AES). Os métodos mais usados para a determinação dos metais pesados consistem na mineralização da parte orgânica da amostra com água-régia. O método aplicado foi digestão a quente com água-régia, e a sua quantificação por ICP-AES.

Os parâmetros azoto orgânico, fósforo, potássio e metais pesados foram determinados para as amostras da fracção sólida do chorume das suiniculturas e da lama da indústria de abate e processamento de carnes de aves no âmbito dos projectos Valorização Agrícola das Lamas de ETARs de Agro-Indústrias através de Compostagem (AGRO 70/2002) e Compostagem de Lamas de Suiniculturas (2008/9). Na tabela 2.1 apresentam-se os parâmetros, os métodos e equipamentos usados na caracterização físico-química das amostras.

Tabela 2.1: Métodos de análise para a caracterização físico-químicas das amostras.

Parâmetros	Método	Equipamento
pH	EN 12176:1998 Alteração à Norma: 2h de agitação	Balança METTLER PJ 3600 DeltaRange; pH-Sartorius PH Meter
Condutividade	CEN/TF2005 Alteração à Norma: 2h de agitação	Balança METTLER PJ 3600 DeltaRange; Conduvímeter ORION 4Star
Humidade	EN 12880:2000	Balança METTLER PJ 3600 DeltaRange e estufa Cassel
Cinzas	EN 12879: 2000	Balança METTLER PJ 3600 DeltaRange, estufa Cassel e mufla Carbolite
Azoto orgânico	EN 13342: 2000	Balança METTLER PJ 3600 DeltaRange, Heating Digester, Velp Scientifica DK6 SMS Scrubber, Pump JP Recirculation Water Aspirator e Destilador Velp Scientifica UDK 130D
Fósforo	Extracção a quente com refluxo Método A descrito na Norma EN 13346: 2000. Doseamento - Método do Ácido vanadomolibdofosfórico, descrito em Sandard Methods 1992	Pharmacia LKD ULtrospec Plus Spectrophotometer
Metais Pesados	Extracção a quente com refluxo Método A descrito na Norma EN 13346: 2000	ICP- AES Horbina Jobin-Yvon modelo Ultima
Potássio	Extracção a quente com refluxo Método A descrito na Norma EN 13346: 2000	ICP- AES Horbina Jobin-Yvon modelo Ultima

### 2.3. Métodos para a caracterização microbiológica

As amostras de resíduos de produção animal foram submetidas a dois protocolos, protocolo 1 e protocolo 2 em simultâneo para a caracterização e identificação de *E. coli*. A aplicação de dois protocolos permitiu maximizar a probabilidade de detecção de estirpes de *E. coli*. Na metodologia seguida, foi utilizado nos dois protocolos o meio selectivo e diferencial MacConkey (CT-SMAC+MUG) como está esquematicamente representado na Figura 2.1.

#### 2.3.1 Protocolo 1

No protocolo 1 usou-se o meio sólido não selectivo trypticase soy agar (TSA) enriquecido com tryptone bile agar liquefeito (TBA), efectuou-se o teste do indol e utilizou-se o meio MacConkey (CT-SMAC+MUG).

Diluiu-se 50 g de amostra fresca em 450 mL de água Milli-Q tipo II, estéril. Após agitação, efectuaram-se várias diluições sucessivas. As soluções foram filtradas usando filtros estéreis de porosidade 0,45 µm (PALL). Colocaram-se os filtros em placas de meio sólido TSA enriquecido com o meio liquefeito TBA. As placas foram incubadas 5 h a 37°C e mais 20 h a 42°C (estufa Cassel®).

Procedeu-se à contagem das colónias e fotografaram-se as placas, imprimiu-se a fotografia e atribuiu-se um número a cada colónia. Repicou-se cada colónia para placas de NA previamente divididas em quadrados numerados de 1-24, 25-48, etc. As placas NA foram incubadas 24 h a 37°C. O filtro foi retirado das placas TSA+ TBA e foi colocado em papel embebido em Reagente de Ehrlich (teste do Indol) que, por incidência de luz ultra violeta (dispositivo de Luz Ultravioleta Model UVGL-58) revelou as colónias de *E. coli* com uma coloração rosa.

Seguidamente, procedeu-se à contagem do número de colónias *E. coli* e registou-se o seu número e posição através da fotografia. Recorrendo às culturas crescidas no meio NA inoculou-se apenas no meio CT-SMAC+ MUG, uma fracção das colónias reveladas como *E. coli* que variou entre 6 a 23 colónias. As placas foram incubadas 24 h a 37°C. A

Figura 2.2 apresenta um exemplo do teste do indol referente às colónias isoladas da amostra A8 (suinicultura).

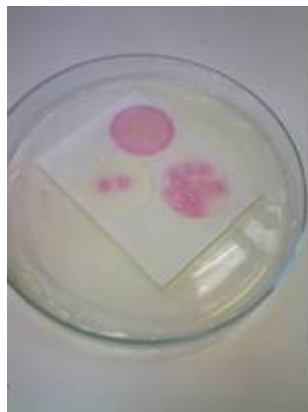


Figura 2.2: Presença de colónias de *E. coli* (colónias rosas) da amostra A8 (S).

Visualizaram-se as colónias pela coloração adquirida. As colónias fermentadoras de sorbitol adquiriram coloração rosa e as não fermentadoras de sorbitol tinham coloração creme/ transparente. Para se testar a acção do MUG, incidiu-se luz ultravioleta sob as placas, as colónias fermentadoras de sorbitol (FS) emitiram fluorescência com um intenso azul, as colónias não fermentadoras de sorbitol (NSF) tiveram resultado negativo, sem emissão de fluorescência. Seleccionaram-se colónias de ambos os fenótipos para ensaios posteriores.

O meio de cultura Agar MacConkey com sorbitol (SMAC) é um meio selectivo e diferencial usado de uma forma convencional na detecção do serótipo de *E. coli* O157:H7. É constituído por peptonas que são fontes de azoto, sais biliares, cloreto de sódio e cristal violeta que são agentes inibitórios das bactérias *Gram positivas* e vermelho neutro que é um indicador de pH que permite a diferenciação através de variações na cor das colónias (Pampulha, 1998). Este meio utiliza D-sorbitol em vez da lactose o que permite diferenciar o serótipo O157:H7 de *E. coli* da maior parte dos outros serótipos pelo facto de não ter a capacidade de fermentar o sorbitol (Scotland *et al.*, 1991). Quando se adiciona ao meio cefixima, telurite de potássio e o composto MUG com a abreviatura de (CT-SMAC+MUG), há um aumento da selectividade com a inibição



de crescimento de estirpes de *E. coli* não-O157, *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Aeromonas*, *Morganella* e de outra microflora (Chapman *et al.*, 1991; Müller e Ehlers, 2004; O'Sullivan *et al.*, 2007).



O composto *4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide* (MUG) é hidrolisado pela enzima β-glucuronidase e forma um composto que emite fluorescência azul sob incidência de luz ultra violeta (Scotland *et al.*, 1991). Cerca de 95 % de estirpes de *E. coli* produz esta enzima, o que não se verifica para as estirpes *E. coli* O157, nomeadamente para o serótipo O157/H7 (Wallace *et al.*, 1997; O’Sullivan *et al.*, 2007).

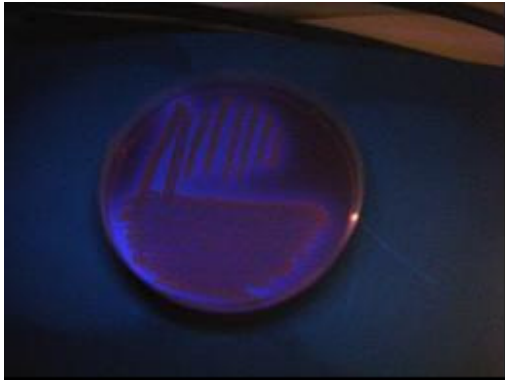


Figura 2.4: Estirpe de *E. coli* em CT-SMAC +MUG isolada da amostra A2. Estirpe fermentadora de sorbitol e de  $\beta$ -glucuronidase, MUG (+).

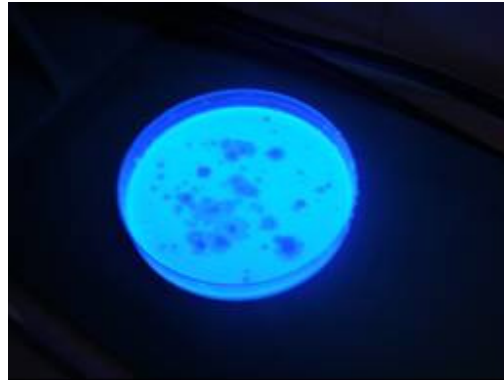


Figura 2.5: Cultura em CT-SMAC MUG da amostra A1, sob luz UV. Observam-se colónias fermentadoras de sorbitol e  $\beta$ -glucuronidase, MUG (+).

### 2.3.2 Protocolo 2

No protocolo 2 usou-se o meio de enriquecimento líquido tryptone soy broth (TSB) e o meio MacConkey (CT-SMAC+ MUG), descrito na secção 2.3.1. O meio de enriquecimento líquido aplicado foi o TSB direccionado para a pesquisa de *E. coli* O157 e outros serogrupos VTEC, referenciado no método 16654 da International Organisation for Standardisation (ISO). Presentemente não há um protocolo de referência para a pesquisa de estirpes EHEC não-O157 e VTEC contudo, segundo diversos estudos, o meio TSB tem sido amplamente usado e optimizado para o isolamento de VTEC (Lahti *et al.*, 2000; Lejeune *et al.*, 2001; Mukherjee *et al.*, 2004; Nicholson *et al.*, 2005; O'Sullivan *et al.*, 2007).

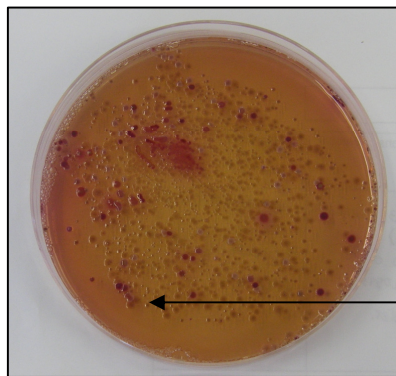
Diluíram-se 50 g de amostra fresca em 450 mL de meio líquido TSB, estéril e incubou-se 12 h a 37°C. Prepararam-se diluições em tubos de ensaio estéreis com 4,5 mL de água destilada estéril e inocularam-se as placas de CT-SMAC + MUG que foram incubadas 24h a 37°C. Colocaram-se as placas sob luz ultra violeta e seleccionaram-se colónias mediante o seu fenótipo, para ensaios posteriores. As Figuras 2.6 e 2.7 ilustram exemplos de culturas isoladas da amostra A3 (S) no meio CT-SMAC +MUG.

Na Figura 2.6 predominam colónias FS, colónias rosas, sem haver praticamente nenhuma alteração na cor do meio de cultura. A Figura 2.7 mostra um exemplo onde a quase totalidade das colónias são NFS, podendo-se visualizar também as colónias FS

(rosas) espalhadas na placa, o meio adquire cor creme devido à intensidade da população bacteriana NFS.



Figura 2.6: Meio de cultura CT-SMAC+MUG. Apresenta colônias rosas características da fermentação do sorbitol (FS).



Colônias rosas,  
fermentadoras de  
sorbitol

Figura 2.7: Meio de cultura CT-MAC+MUG. Apresenta uma larga maioria de colônias cremes (NFS), visualizando-se algumas colônias rosas (FS).

A Figura 2.8 representa duas estirpes isoladas da amostra A2 (Abate) sendo a estirpe na parte superior da placa não fermentadora de sorbitol e a estirpe na parte inferior fermentadora de sorbitol com coloração rosa.

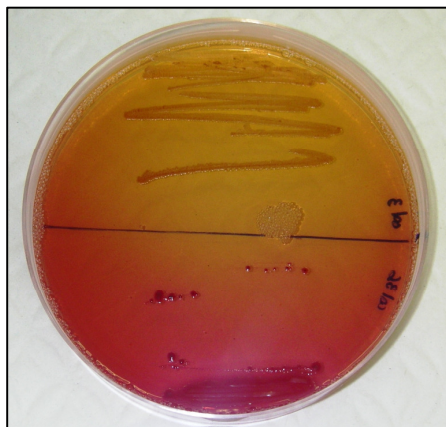


Figura 2.8: Duas estirpes de *E. coli* isoladas da amostra A2. Uma FS (superior) e outra NFS (inferior).

Em seguida, apresenta-se na tabela 2.2 a composição dos reagentes, dos meios de cultura e sua composição, marcas e concentração.

Tabela 2.2: Meios de cultura e sua composição, marcas e concentração.

Meios de cultura / Reagentes	Componentes e concentrações	Marcas
TSA <sup>(1)</sup> trypticase soy agar	Tryptone / 1,5 % (p/v)	Difco
	Soytone / 0,5 % (p/v)	Difco
	NaCl / 1,5 % (p/v)	Sigma
	Agar / 1,5 % (p/v)	Biocar
TBA <sup>(1,3)</sup> liquefeito	Tryptone Bile / 3,65 % (p/v)	Sigma
CT-SMAC <sup>(1,2)</sup>	Base / 50 g L <sup>-1</sup>	Biocar
	Mug	Biocar
	Cefixime	Biocar
Reagente Ehlerich <sup>(1)</sup>	Dimetilaminobenzaldeído 0,5g com HCl 1M	-
TSB triptone soya Broth <sup>(2)</sup>	30 g L <sup>-1</sup>	Biocar
NA nutriente agar <sup>(1,2)</sup>	20 g L <sup>-1</sup>	Merk
	Tryptone / 1 % (p/v)	Difco
LB	Extracto de levedura / 0,5 % (p/v)	-
	NaCl / 1 % (p/v)	Sigma
Etanol		Merk (PA)

<sup>(1)</sup> Meios de cultura usados no protocolo 1. <sup>(2)</sup> Meios de cultura usados no protocolo 2. <sup>(3)</sup> TBA guardar em estufa a 50 °C após autoclavar.

#### 2.4. Conservação das culturas

Cada amostra gerou um número de culturas do protocolo 1 e do protocolo 2. Seleccionaram-se 88 culturas de ambos os protocolos para conservação/congelamento pelo método das esferas de vidro. Os criotubos foram guardados em caixas próprias em câmara de frio a -80°C.

#### 2.5. Crescimento em meios de glucose e sorbitol

As estirpes foram inoculadas em meios líquidos mínimos com duas fontes de carbono diferentes glucose e sorbitol, e no o meio líquido controlo sem fonte de carbono. A composição base dos meios, adaptada de Madigan *et al.* (2005) foi a seguinte: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,7%p/v), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,2%p/v), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,1%p/v), MgSO<sub>4</sub> (0,01%p/v), CaCl<sub>2</sub> (0,002%p/v), fonte de carbono e solução de oligoelementos (0,1% v/v).

A solução de oligoelementos foi composta por: FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (0,15%p/v), CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,019%p/v), MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (0,01%p/v), ZnCl<sub>2</sub> (0,007%p/v), Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,0036%p/v), NiCl<sub>2</sub> (0,0024%p/v), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0,0006%p/v), CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,0002%p/v) e 10 ml de HCl a 25%. A fonte de carbono foi D-Glucose e D-Sorbitol (0,5%p/v).

Em tubos de ensaio estéreis colocaram-se 5 mL de cada meio de cultura. Retirou-se de uma cultura pura no meio NA uma porção que foi dissolvida no tubo de ensaio com 5 mL de água destilada. Em seguida, transferiu-se 0,1 mL do tubo com a cultura em suspensão para cada tubo com os diferentes meios líquidos, meio com glucose, meio com sorbitol e meio sem fonte de carbono. Os tubos foram incubados a 37°C sem agitação durante sete dias. O crescimento das estirpes foi registado diariamente, utilizando-se um papel contendo 3 linhas desenhadas a preto colocado atrás de cada tubo e verificando a turvação da solução. Foi adaptada uma terminologia baseada em cores para diferenciar o crescimento das estirpes nos meios com as diferentes fontes de carbono. A cor verde escura foi escolhida para representar o crescimento forte e rápido quando verificado nas primeiras 24h de incubação com uma turvação da solução muito intensa, a cor verde-claro representa o crescimento lento ou seja, crescimento tardio e com uma turvação menos intensa. A cor amarela indica um crescimento fraco mesmo quando verificado nas 24-48h de ensaio, e com uma turvação muito fraca, finalmente a cor vermelha indica ausência de crescimento.

## 2.6. Pesquisa de produção de hemolisinas

Para o teste à produção de hemolisinas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e enterohemolisina), foram adquiridas placas prontas de agar enterohemolisina da Oxoid®. Efectuaram-se sucessivas diluições das culturas puras previamente crescidas no meio NA em tubos de ensaio com 4,5 mL de água estéreis com o objectivo de se obterem colónias isoladas no meio de cultura a testar. O crescimento e formação das colónias foram observados após 3h, 6h e 24h de incubação a 37°C. As Figuras 2.9 e 2.10 mostram exemplos da produção de  $\alpha$ -hemolisina e enterohemolisina.

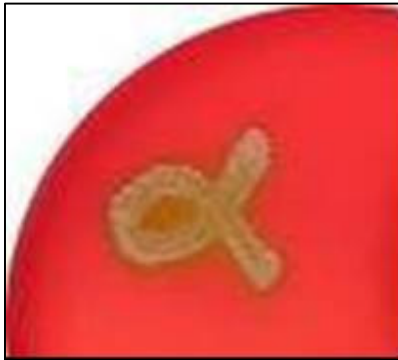


Figura 2.9: Exemplo de produção de  $\alpha$ -hemolisina. Adaptada de ASM Microlibrary (2010).

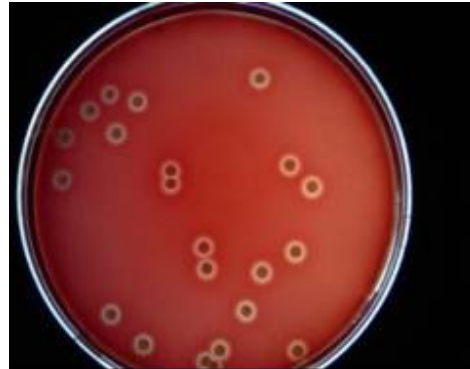


Figura 2.10: Exemplo de produção de Ehx (enterohemolisina) por *E. coli* O157:H7. Adaptado de Boczek (2005).

A produção das várias espécies de hemolisinas ocorre após diferentes períodos de incubação, a de  $\alpha$ -hemolisina é visualizada após 3 a 6h de incubação (Figura 2.9) enquanto a de  $\beta$ -hemolisina após 22 a 24h e a de enterohemolisina após 20 a 24h de incubação a 37 °C. Quando não ocorre hemólise regista-se como estirpe não hemolítica. A Figura 2.10 representa um exemplo da produção da enterohemolisina pelo serótipo de *E. coli* O157:H7. A hemólise provocada pela enterohemolisina traduz-se morfológicamente, por halos pequenos e colónias turvas.

## 2.7. Pesquisa de genes de virulência

Para pesquisar a presença de genes de virulência extraiu-se o DNA das estirpes isoladas de *E. coli* sendo depois submetido à técnica de PCR. Para as reacções de PCR foram utilizadas estirpes de controlo que foram gentilmente cedidas pela Professora Doutora Constança Pomba do Laboratório da Resistência aos Antibióticos e Biocidas, da Faculdade Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa.

### 2.7.1 Estirpes de controlo

Na tabela 2.3 estão representadas as estirpes de controlo utilizadas no presente estudo.

Tabela 2.3: Estirpes de controlo usadas neste estudo

Estirpes de controlo	Origem	Serótipo / Fenótipo	Referência
<b>ATCC 43895 (American Type Culture Collection)</b> <sup>(1)</sup>	Humana	O <sup>157</sup> / VT <sub>1</sub> <sup>+</sup> VT <sub>2</sub> <sup>+</sup> eaeA <sup>+</sup>	Colecção de Dr. Wim Gaatra, DDII University of Utrecht, Holanda
<b>1537</b>	Suína	O <sup>8</sup> :K <sup>87</sup> / K88 <sup>+</sup> LT <sup>+</sup>	Laboratório da Resistência aos Antibióticos e Biocidas da FMV/UTL
<b>E 57</b>	Suína (DE) <sup>(2)</sup>	O138:K81 / VT <sub>2e</sub> <sup>+</sup> F <sub>18</sub> <sup>+</sup> ST <sub>1a</sub> <sup>+</sup> ST <sub>II</sub> <sup>+</sup>	Beutin <i>et al.</i> (1995) Blanco <i>et al.</i> (1997)

<sup>(1)</sup> DNA. <sup>(2)</sup> DE - Doença dos Edemas.

### 2.7.2 Extracção de DNA

A extracção do DNA cromossómico das estirpes de *E. coli* foi adaptada de Féria *et al.* (2001). Estirpes com 24 h de crescimento em meio NA foram inoculadas em 50 mL de meio líquido LB (Luria-Bertani). Foram incubadas com agitação lenta e constante durante 12 h a 37 °C. Suspendeu-se 1,5 mL de cultura num tubo de 1,5 mL e centrifugou-se 8 min a 18000 g. Decantou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* com 500 µL de água MiliQ tipo I, estéril e centrifugou-se 3 mins a 18000 g. Decantou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 µL água Milli-Q<sup>®</sup> tipo I estéril. Levou-se à ebulição no bloco de aquecimento (Alfagen Grant-bio). Centrifugou-se 8 min a 18000g. Retirou-se o sobrenadante contendo o DNA para um tubo e guardou-se a -20°C.

### 2.8. PCR

O DNA das estirpes de *E. coli* em estudo foi submetido à técnica de PCR para a detecção de sete genes de virulência, com *primers* específicos para o gene codificante para a intimina (*eaeA*), para os genes que codificam para as toxinas (VT<sub>1</sub>, VT<sub>2</sub>, LT, ST<sub>I</sub>), para o plasmídeo (EAF) e para o gene *ial*. Os oligonucleótidos (*primers*) usados foram sintetizados comercialmente pela STAB Vida<sup>®</sup>. Para a amplificação dos genes codificadores da intimina (*eaeA*) e das toxinas VT<sub>1</sub> (*vt<sub>1</sub>*) e VT<sub>2</sub> (*vt<sub>2</sub>*), usaram-se dois conjuntos de *primers*, um referenciado como standard pela World Organisation for Animal Health (OIE) e o outro desenhado pela Professora Doutora Constança Pomba. Os *primers* usados para a amplificação dos genes das toxinas LT, ST<sub>I</sub>, *ial* e o plasmídeo EAF foram também gentilmente cedidos pela Professora Doutora Constança Pomba. Os

*primers* foram preparados de acordo com as normas do fabricante e as respectivas diluições foram feitas com água Milli-Q® tipo I, estéril, de modo a obter a concentração inicial de 100 pmoles  $\mu\text{L}^{-1}$ . A opção de se utilizarem dois conjuntos de *primers* para a amplificação das toxinas VT<sub>1</sub>, VT<sub>2</sub> e a intimina, deriva do facto de um conjunto ser credenciado pela OIE e o outro ter sido anteriormente experimentado com sucesso. Estas condições permitiram a elaboração dum procedimento fiável e com mais hipóteses de êxito. Neste estudo foram utilizadas concentrações de *primers* de 10 pmoles  $\mu\text{L}^{-1}$ , 5 e 25 pmoles  $\mu\text{L}^{-1}$ , sendo consideradas as mais adequadas na amplificação dos fragmentos. Para aumentar o rendimento e a especificidade das reacções de PCR geralmente adiciona-se um adjuvante, e neste caso foi utilizado a albumina sérica bovina (BSA) a 4%. Seguidamente, a Tabela 2.4 indica as sequências dos *primers*, produtos de amplificação e referências que foram utilizados no presente estudo.

Tabela 2.4: Sequências dos *primers* para a detecção dos genes que codificam os factores de virulência, dimensão do produto gerado e referências.

Gene alvo	Sequências dos <i>primers</i> (5'- 3')	DPA <sup>(1)</sup> (pares de bases)	Referência
VT <sub>1</sub>	Fw CGCTCTGCAATAGGTACTCC	256	OIE
	Rv CGCTGTTGTACCTGGAAAGG		
VT <sub>1</sub>	Fw CTGTGGCAAGAGCGATGTTA	163	FMV
	Rv CTCAACCTTCCCCAGTTCAA		
VT <sub>2</sub>	Fw TCCATGACAACGGACAGCAG	185	OIE
	Rv GCTTCTGCTGTGACAGTGAC		
VT <sub>2</sub>	Fw GTTCCGGAATGCAAATCAGT	235	FMV
	Rv CCCCAGTTCAGAGTGAGGTC		
<i>eaeA</i>	Fw GCTTAGTGCTGGTTTAGGATTG	618	OIE
	Rv CCAGTGAACTACCGTCAAAG		
<i>eaeA</i>	Fw ACCAGATCGTAACGGCTGCCTGA	471	FMV
	Rv ATGTTGGGTATAACGTCTTCCATTG		
STI	Fw TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG	147	FMV
	Rv CTTGACTCTTCAAAAGAGAAAATTAC		
LT	Fw GGCGACAGATTATACCGTGC	696	FMV
	Rv CCGAATTCTGTTATATATGTC		
EAF	Fw CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA	397	FMV
	Rv TATGGGGACCATGTATTATCA		
<i>ial</i>	Fw CTGGATGGTATGGTGAGG	320	FMV
	Rv GGAGGCCAACAATTATTTC		

OIE - World Organization for Animal Health. FMV- Faculdade Médica Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa. <sup>(1)</sup> DPA - Dimensão do produto de amplificação.



No presente estudo foi utilizado para as reacções de PCR um “*Kit eppendorf HotmasterMix (2,5x)*”. A mistura reaccional (Master Mix) foi realizada num volume de 50 µL. Distribuiu-se a Master Mix pelos tubos de reacção e por último adicionou-se o DNA em estudo. Colocaram-se os tubos de reacção no termociclador (Biometra® UNO II) e definiu-se o programa a usar.

#### 2.8.1 Protocolos utilizados nas reacções de PCR

Foi definido um protocolo base adaptado de Peixoto (2006). A tabela 2.5 mostra um exemplo de uma reacção de PCR com todos os seus componentes e volume necessários para uma Master Mix de 11 reacções.

Tabela 2.5: Exemplo de uma reacção de PCR; os componentes da reacção para o gene alvo, volume de uma reacção e volume para 11 reacções.

Componentes da reacção de PCR	Volume (µL) (1x)	Volume (µL) (11x)
Água MiliQ tipol, esterilizada	25	275
Kit eppendorf Hotmaster Mix (2,5x)	20	220
<i>Primer</i> Foward (10 pmoles µL <sup>-1</sup> )	1	11
<i>Primer</i> Reverse (10 pmoles µL <sup>-1</sup> )	1	11
BSA 4% (adjuvante)	1	11
DNA alvo	2	22
Volume total	50	550

Na tabela 2.6 apresentam-se os protocolos utilizados na pesquisa dos genes que codificam para os factores de virulência de estirpes de *E. coli*

Tabela 2.6: Protocolos utilizados na pesquisa dos genes codificadores para os factores de virulência de estirpes de *E. coli*.

Gene alvo	Concentração (pmoles $\mu\text{L}^{-1}$ )	Primers Ref.	Condições do programa de PCR					Número de ciclos
			Desnaturação inicial	Desnaturação	Temperatura annealing	Extensão	Extensão final	
<i>eaeA</i>	10	OIE	94 °C, 2 mins	94 °C, 30 seg	62 °C, 90 seg	65 °C, 90 seg	65 °C, 10 mins	35
<i>eaeA</i>	5	FMV	94 °C, 2 mins	94 °C, 30 seg	65 °C, 90 seg	65 °C, 90 seg	65 °C, 10 mins	35
VT <sub>1</sub>	25	OIE	94 °C, 2 mins	94 °C, 30 seg	58 °C, 90 seg	65 °C, 90 seg	65 °C, 10 mins	35
VT <sub>1</sub>	25	FMV	94 °C, 2 mins	94 °C, 30 seg	58 °C, 90 seg	65 °C, 90 seg	65 °C, 10 mins	35
VT <sub>2</sub>	10	OIE	94 °C, 2 mins	94 °C, 30 seg	58 °C, 90 seg	65 °C, 90 seg	65 °C, 10 mins	35
VT <sub>2</sub>	10	FMV	94 °C, 2 mins	94 °C, 30 seg	66 °C, 90 seg	65 °C, 90 seg	65 °C, 10 mins	35
LT	10	FMV	95 °C, 5 mins	95 °C, 5 mins	51 °C, 30 seg	65 °C, 90 seg	65 °C, 7 mins	30
STI	10	FMV	95 °C, 5 mins	95 °C, 5 mins	51 °C, 30 seg	65 °C, 90 seg	65 °C, 7 mins	30
EAF	10	FMV	95 °C, 5 mins	95 °C, 5 mins	51 °C, 30 seg	65 °C, 90 seg	65 °C, 7 mins	30
<i>ial</i>	10	FMV	95 °C, 5 mins	95 °C, 5 mins	51 °C, 30 seg	65 °C, 90 seg	65 °C, 7 mins	30

## 2.9. Sequenciação de DNA

Presentemente, a sequenciação de DNA é automatizada e existem laboratórios que comercializam este serviço de uma forma rápida e relativamente económica. A colecção, a organização, a análise e comparação de sequências de DNA e de sequências de proteínas são armazenadas e partilhadas em bancos de dados, como *GenBank* nos EUA e *EMBL Sequence Database* na Europa, estando também disponíveis na internet para a comunidade científica. O Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), é uma das ferramentas de software mais usadas disponibilizado pelo Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI) que permite pesquisar e comparar sequências novas com as que estão presentes na base de dados (Peixoto, 2006).

Para a sequenciação de DNA foi necessário efectuar a purificação do produto de PCR, para tal foi utilizado o Kit de purificação (GE Healthcare®) e procedeu-se de acordo com o manual do fabricante. Efectuou-se a quantificação de ácidos nucleicos no Nano Drop Spectrophotometer® ND 1000, através da leitura das absorvâncias a 260 nm.

A amostra a sequenciar foi enviada para um laboratório que presta este serviço comercialmente e os resultados foram processados em computador.

## 2.10. Análise estatística

A análise estatística de dados foi processada através do programa STATISTICA base 6,0 (Basic Statistical Analysis Methods).

## CAPÍTULO 3

### APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

#### 3.1. Análises físico-químicas

Neste projecto foram estudadas nove amostras de resíduos de produção animal as quais se podem agrupar no que respeita à sua origem e aos tratamentos aplicados nas explorações. Um grupo engloba duas amostras de estrume bovino, outro comporta duas amostras de lamas, uma proveniente de uma suinicultura com digestão anaeróbia e outra da indústria de abate e processamento de carnes de aves, e o ultimo grupo é referente às cinco amostras provenientes de suiniculturas, constituídas pela fracção sólida do chorume. Na tabela 3.1 apresenta-se a localização das explorações, data de colheita e o tipo de amostras recolhidas.

Tabela 3.1: Data de colheita, origem, composição e localização das explorações em que se colheram amostras

Amostras	Data de recolha	Origem	Composição	Localização
A1	30 Março 09	S	Lama digerida	Santarém
A2	15 Abril 09	A	Lama	Azambuja
A3	19 Maio 09	S	Fracção sólida do chorume	Torres Vedras
A4	19 Maio 09	E	Estrume bovino	Torres Vedras
A5	01 Junho 09	E	Estrume bovino	Samora Correia
A6	16 Junho 09	S	Fracção sólida do chorume	Santarém
A7	16 Junho 09	S	Fracção sólida do chorume	Fornos de Salvaterra
A8	23 Junho 09	S	Fracção sólida do chorume	Cartaxo
A9	24 Junho 09	S	Fracção sólida do chorume	Benavente

A: Abate e processamento de carne de aves; S: suinicultura; E: estrume bovino

O aspecto visual das amostras diferiu consoante a sua origem e constituição. As amostras de suiniculturas apresentaram geralmente cor acastanhada escura, com textura pastosa e odor intenso, as amostras de estrume tinham cor castanha clara, em aglomerados, vários materiais presentes das camas dos animais e odor típico de estrume e com difícil manuseamento. As figuras 3.1 e 3.2 apresentam o aspecto de uma amostra da fracção sólida do chorume de uma suinicultura e de estrume de bovino.



Figura 3.1: Amostra da fracção sólida do chorume de uma suinicultura.



Figura 3.2: Amostra de estrume.

Nas tabelas 3.2 e 3.3 apresentam-se os resultados da caracterização físico-química referente às amostras de resíduos de produção animal.

Analisando os parâmetros medidos representados na Tabela 3.2 verifica-se que, de um modo geral, contêm propriedades que lhes conferem valor agronómico, mas também algumas características passíveis de originar efeitos adversos no ambiente. A maioria das amostras apresentam uma percentagem de humidade acima dos 70%, são ricas em matéria orgânica, o valor de pH situa-se na zona de neutralidade a básica entre 5,9 e 8,7 e têm maioritariamente valores de condutividade elevada ( $4080 \mu\text{s.cm}^{-1}$ ). Para cada parâmetro, a comparação das médias obtidas foi efectuada através do teste de comparação múltiplo de médias Duncan para um intervalo de confiança de 95%. Para cada parâmetro, a média seguida da mesma letra não são significativamente diferentes a 95%.

Tabela 3.2: Resultados das análise físico-químicas referentes às amostras estudadas

<b>Amostra/Origem<sup>(1)</sup>/ Tipo<sup>(2)</sup></b>	<b>pH ± ME<sup>(3)</sup></b>	<b>Condutividade (<math>\mu\text{s} \cdot \text{cm}^{-1}</math>) ± ME</b>	<b>Humidade (%) ± ME</b>	<b>Cinzas (%) ± ME</b>
<b>A1/S/ Ld</b>	8,36 ± 0,06 b	1235 ± 168 de	80,27 ± 0,31 b	15,56 ± 0,59 b
<b>A2/A/ L</b>	5,90 ± 0,01 f	627 ± 507 f	82,97 ± 0,19 a	10,17 ± 0,18 d
<b>A4/E/ Est</b>	8,81 ± 0,34 a	3483 ± 0,47 b	69,13 ± 1,23 f	16,80 ± 0,13 b
<b>A5/E/ Est</b>	7,09 ± 0,11 e	4080 ± 1,99 a	57,48 ± 4,73 h	11,89 ± 0,33 c
<b>A3/S/ Fsc</b>	8,19 ± 0,12 c	1452 ± 151 cd	79,00 ± 0,39 bc	11,93 ± 0,49 c
<b>A6/S/ Fsc</b>	8,72 ± 0,25 a	1906 ± 132 d	74,34 ± 0,25 d	7,67 ± 0,35 e
<b>A7/S/ Fsc</b>	8,45 ± 0,04 b	2545 ± 388 c	78,71 ± 0,59 c	21,77 ± 1,62 a
<b>A8/S/ Fsc</b>	5,97 ± 0,13 f	993 ± 263 def	71,06 ± 2,29 e	8,76 ± 0,78 d
<b>A9/S/ Fsc</b>	8,01 ± 0,26.d	846 ± 520 ef	64,57 ± 0,72 g	9,33 ± 1,03 d

Os valores correspondem a médias de 3 réplicas com a margem de erro (ME) associada, a 95%. Para cada parâmetro, médias seguidas pela mesma letra, não são significativamente diferentes a 95% (Teste de Duncan). <sup>(1)</sup> S- Suinicultura, A- Abate e processamento de carnes de aves, E- Estrume bovino, <sup>(2)</sup> Ld- Lama digerida, L- Lama, Est- Estrume bovino, Fsc- Fração sólida do chorume.

Segundo o Teste de Duncan, os valores de pH mostram algumas diferenças, A4(E) e A6(S) são amostras que não diferem entre si mas são diferentes de A2(A) e A8(S) que apresentam valores mais baixos. Os resultados da condutividade mostram algumas diferenças significativas e margens de erro elevadas, a amostra A5(S) evidenciou diferenças significativas em relação às restantes, a amostra A4(S) tendo tem um valor elevado não sendo considerada igual a A5(E), o valor mais baixo do conjunto foi obtido pela amostra A2(A). Para o parâmetro da humidade, o valor da A2(A) é significativamente diferente dos outros valores sendo o valor mais elevado. O parâmetro das cinzas apresenta maior homogeneidade e menor margem de erro. As amostras A2(M), A8(S) e A9(S) não são significativamente diferentes, A1(S) e A4(E) são similares assim como A5(E) e A3(S). Os resultados obtidos estão em conformidade com os trabalhos de Avery *et al.* (2005) e Nicholson *et al.* (2005) Por outro lado tinham, um teor excessivo de água e odores desagradáveis, resultantes da provável libertação de gases como NH<sub>3</sub>, CH<sub>4</sub>, e N<sub>2</sub>O provenientes de processos físico-químicos e biológicos associados á degradação da matéria orgânica, o que dificulta não só a aplicação dos resíduos ao solo, bem como a sua armazenagem, transporte e espalhamento, o que

limita o aproveitamento do seu valor fertilizante e podendo originar problemas de poluição ao nível do solo, do ar e da água (Calouro, 2005; Petersen *et al.*, 2007).

Como referido no Capítulo 2, secção 2.1.1, seis explorações (A2, A3, A6, A7, A8 e A9) foram visitadas no âmbito do projecto (AGRO 70/2002) (Silveira *et al.*, 2005) e uma suinicultura (A1) visitada no âmbito do projecto Compostagem de Lamas de Suiniculturas (2008/9) (Silveira *et al.*, 2009). Nesses projectos foi efectuada a caracterização físico-química das amostras que se resolveu apresentar como informação adicional apesar do tempo decorrido. A tabela 3.3 indica os resultados do azoto orgânico, fósforo, potássio e metais pesados obtidos na altura.

Tabela 3.3: Resultados de NPK e metais pesados das amostras.

Amostra/Origem <sup>(1)</sup> / Tipo <sup>(2)</sup>	N orgânico	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	Cd <sup>(3)</sup>	Cr	Cu	Ni	Pb <sup>(4)</sup>	Zn
	(%)			(mg kg <sup>-1</sup> ps)					
A1/S/Ld	2,07	0,15	0,74	<0,01	32,7	83	24,5	3,28	276
A2/S/L	6,75	0,08	1,03	0,16	24,9	50	25,9	4,96	244
A3/S/Fsc	1,26	0,01	1,25	<0,01	4,5	83	5,4	<0,35	128
A6/S/Fsc	1,43	0,02	0,70	<0,01	4,6	159	6,3	<0,35	856
A7/S/Fsc	2,03	0,05	0,58	<0,01	9,2	253	8,0	<0,35	773
A8/S/Fsc	1,85	0,04	0,37	<0,01	5,1	151	5,5	<0,35	599
A9/S/Fsc	1,37	0,07	0,91	<0,01	8,0	200	10,8	<0,35	820

<sup>(1)</sup> S- Suinicultura, A- Abate e processamento de carnes de aves, E- Estrume bovino, <sup>(2)</sup> Ld- Lama digerida, L- Lama, Est- Estrume bovino, Fsc- Fração sólida do chorume. <sup>(3)</sup> Valores de concentração de Cádmio inferiores ao LD (limite de detecção) < 2 µg L<sup>-1</sup> (< 0.01 mg kg<sup>-1</sup> ps). <sup>(4)</sup> Valores de concentração de Chumbo inferiores ao LD < 5 µg L<sup>-1</sup> (< 0.35 mg kg<sup>-1</sup> ps).

A tabela 3.3 apresenta os resultados de nutrientes, NPK (fósforo, azoto orgânico e potássio) e metais pesados para o conjunto das amostras indicadas. As concentrações de fósforo, potássio e do azoto orgânico em percentagem (excepto para a amostra A2) são relativamente baixas o que implica baixos teores disponíveis para as culturas quando estes materiais são usados como correctivos orgânicos e incorporados no solo. As concentrações de cádmio, cobre, crómio, níquel, chumbo e zinco são muito reduzidas, quando comparadas com os valores máximos para aplicação de lamas ao solo previstos pelo Working Document on Sludge (2000) e pelo Decreto-Lei nº 276/2009.

### 3.2. Análises microbiológicas

A tabela 3.4 apresenta os resultados obtidos na aplicação dos protocolos 1 e 2 na quantificação de *E. coli* em TSA+TBA e CT-SMAC+MUG, respectivamente.

Tabela 3.4: Quantificação de *E. coli* em TSA +TBA e em CT-SMAC+MUG.

Amostra/Origem <sup>(1)</sup> /Tipo <sup>(2)</sup>	Quantificação de <i>E. coli</i> ufc (gph <sup>-1</sup> )	Presença/ausência de <i>E. coli</i> em CT-SMAC+MUG		Quantificação de <i>E. coli</i> ufc (gph <sup>-1</sup> )	Quantificação de <i>E. coli</i> em CT-SMAC+MUG ufc (gph <sup>-1</sup> )	
		Protocolo 1 TSA+TBA	Protocolo 1 FS <sup>(3)</sup> NFS <sup>(4)</sup>		Protocolo 2 CT-SMAC+MUG	Protocolo 2 FS NFS
A1/S/Ld	5,9. 10 <sup>5</sup>	+	-	2,9. 10 <sup>7</sup>	2,9. 10 <sup>6</sup>	2,6. 10 <sup>7</sup>
A2/A/L	5,4. 10 <sup>6</sup>	+	+	9,5. 10 <sup>6</sup>	7,2. 10 <sup>6</sup>	2,3. 10 <sup>6</sup>
A4/E/Est	1,5. 10 <sup>5</sup>	+	+	1,2. 10 <sup>7</sup>	1,1. 10 <sup>7</sup>	1,3. 10 <sup>6</sup>
A5/E/Est	9,9. 10 <sup>7</sup>	+	+	1,4. 10 <sup>7</sup>	1,2. 10 <sup>7</sup>	5,4. 10 <sup>5</sup>
A3/S/Fsc	9,0. 10 <sup>5</sup>	+	+	1,6. 10 <sup>8</sup>	1,5. 10 <sup>8</sup>	9,0. 10 <sup>6</sup>
A6/S/Fsc	7,2. 10 <sup>5</sup>	-	+	1,4. 10 <sup>7</sup>	1,2. 10 <sup>6</sup>	1,2. 10 <sup>7</sup>
A7/S/Fsc	4,5. 10 <sup>5</sup>	+	+	1,1. 10 <sup>8</sup>	1,4. 10 <sup>7</sup>	9,5. 10 <sup>7</sup>
A8/S/Fsc	8,1. 10 <sup>7</sup>	+	+	1,0. 10 <sup>8</sup>	7,9. 10 <sup>7</sup>	2,4. 10 <sup>7</sup>
A9/S/Fsc	1,8. 10 <sup>7</sup>	+	+	1,1. 10 <sup>8</sup>	9,4. 10 <sup>7</sup>	1,4. 10 <sup>7</sup>

<sup>(1)</sup> S- Suinicultura, A- Abate e processamento de carnes de aves, E- Estrume. <sup>(2)</sup> Ld- Lama digerida, L- Lama, Est- Estrume bovino, Fsc- Fracção sólida do chorume. <sup>(3)</sup> FS- Fermentadora de sorbitol, <sup>(4)</sup>NFS- Não fermentadora de sorbitol

Como referido no Capítulo2, na aplicação do protocolo 1 (TSA+TBA) foi inoculada no meio CT-SMAC+MUG apenas uma fracção das colónias reveladas como *E. coli*, apresentando-se a sua presença/ausência neste meio. Verifica-se uma densidade elevada de ocorrência de *E. coli* em todas as amostras dos três grupos nos dois protocolos. A densidade de *E. coli* em ufc (g ph<sup>-1</sup>) no protocolo 1 varia entre 10<sup>5</sup> e 10<sup>7</sup> e no protocolo 2 entre 10<sup>6</sup> e 10<sup>8</sup>. Embora na mesma ordem de grandeza, a quantificação de *E. coli* no protocolo 2 é superior, sendo mais elevada em particular no grupo de amostras de origem suínica A3,A6, A7, A8 e A9 (Fsc). As amostras de estrume bovino e de lamas têm uma densidade de *E. coli* similar nos dois protocolos. O protocolo 2 parece favorecer o crescimento de *E. coli* em ufc (g ph<sup>-1</sup>) relativamente ao protocolo 1, conforme verificado pelo nível de significância obtido (P = 0,008) pela comparação dos



dois através do teste T. No meio CT-SMAC+MUG, todas as amostras geram colónias FS e NFS. Analisando a sua distribuição nos três grupos no protocolo 2, os resultados apontam para uma densidade superior de colónias FS de *E. coli* nas amostras de estrume bovino A4 e A5, enquanto que para os outros dois grupos a distribuição entre colónias FS e NFS é semelhante, com excepção da A3 (S) também com uma elevada densidade de colónias FS. De um modo geral, os resultados indicam uma prevalência de colónias FS com apenas duas excepções a A1(S) lama digerida e A6(S) fracção sólida do chorume, sugerindo uma menor suspeita da presença de factores de virulência. No protocolo 2 54,2% das colónias são FS e 45,8 % são NFS. Não há nenhuma diferença entre os três grupos de amostras que destaque a influência que a origem e os tratamentos a que foram submetidas possam exercer sob a capacidade de fermentarem ou não o sorbitol.

Na impossibilidade de caracterizar todas as estirpes isoladas das nove amostras resultantes da inoculação no meio CT-SMAC+MUG dos dois protocolos, efectuou-se uma selecção aleatória de estirpes isoladas de cada amostra com base nos fenótipos NFS e FS. Segundo este critério, seleccionaram-se 41 estirpes da colecção de 88 estirpes (Capítulo 2, secção 2.4) para ensaios posteriores. Na tabela 3.5 indicam-se as estirpes seleccionadas referentes às nove amostras.

Tabela 3.5: Estirpes seleccionadas das nove amostras.

<b>Amostras /Origem<sup>(1)</sup> /Tipo<sup>(2)</sup></b>	<b>Estirpes</b>
<b>A1/S/ Ld</b>	ZC001, ZC002, ZC003
<b>A2/A/ L</b>	ZC019, ZC020, ZC021, ZC028
<b>A4/E/ Est</b>	ZC053, ZC054, ZC057, ZC068
<b>A5/E/ Est</b>	ZC070, ZC073, ZC077, ZC086, ZC091
<b>A3/S/ Fsc</b>	ZC031, ZC032, ZC037, ZC038, ZC042, ZC043
<b>A6/S/ Fsc</b>	ZC096, ZC097, ZC099, ZC106
<b>A7/S/ Fsc</b>	ZC110, ZC113, ZC119, ZC120
<b>A8/S/ Fsc</b>	ZC128, ZC131, ZC134, ZC135, ZC144, ZC155,
<b>A9/S/ Fsc</b>	ZC160, ZC162, ZC163, ZC167

<sup>(1)</sup> S- Suinicultura, A- Abate e processamento de carnes, E- Estrume. <sup>(2)</sup> Ld- Lama digerida, L- Lama, Est- Estrume bovino, Fsc- Fracção sólida do chorume.

### 3.3. Ensaios de crescimento em glucose e sorbitol

As estirpes foram inoculadas em meios líquidos mínimos com glucose ou sorbitol, sendo usado um controlo negativo sem fonte de carbono. Na Figura 3.3 comparam-se os resultados destes ensaios de crescimento com os resultados da inoculação das estirpes no meio CT-SMAC+MUG, com sorbitol. Na maioria das estirpes, a fase de crescimento ocorreu nas 48h iniciais, após as quais se verificou uma estabilização que corresponde à fase estacionária, sem nenhuma alteração visível até ao final dos ensaios. Verifica-se ainda que a estirpe ZC002, proveniente da amostra A1(S) teve crescimento nulo em ambos os meios nas três réplicas efectuadas. Todas as outras estirpes cresceram no meio com glucose, a maior parte com crescimento forte e rápido, enquanto que no meio líquido com sorbitol todas as estirpes, excepto a ZC002(A1), revelaram um comportamento diferente, com crescimento mais fraco e lento. Verifica-se uma clara associação entre as estirpes que tiveram um crescimento forte e rápido em glucose e mais lento e fraco em sorbitol, e as estirpes FS no meio CT-SMAC+MUG. As estirpes NFS no meio sólido CT-SMAC+MUG revelaram mais dificuldade em crescer nos meios líquidos mesmo com glucose, enquanto no meio com sorbitol o crescimento foi muito reduzido chegando mesmo a ser nulo em seis estirpes (ZC002(A1), ZC053 e ZC054 da A4, ZC086(A5), ZC119(A7) e ZC163(A9)). Três estirpes isoladas das amostras A8 e A9 (ZC128, ZC144 e ZC162) tiveram crescimento forte e rápido nos meios líquidos o que está de acordo com os resultados no meio CT-SMAC+MUG. A origem e constituição das amostras parece não influenciar o crescimento das estirpes nos diferentes meios líquidos, contudo no grupo das amostras suínolas A3, A6, A7, A8 e A9 evidenciam-se três estirpes (ZC031 e ZC032 da A3 e ZC143(A8)) que, apesar de crescerem nos meios líquidos de glucose e sorbitol, não metabolizaram o sorbitol em CT-SMAC+MUG. A estirpe ZC119(A7), FS em CT-SMAC+MUG teve um crescimento fraco nos meios líquidos em glucose e nulo em sorbitol. Os resultados do conjunto global das estirpes no meio líquido com sorbitol são concordantes com os respectivos resultados do meio sólido CT-SMAC+MUG, ou seja, quase a totalidade das estirpes FS no meio CT-SMAC+MUG, com excepção da ZC119, revelaram crescimento lento no meio líquido com sorbitol, enquanto as NFS em CT-SMAC+MUG tiveram crescimento fraco ou nulo no meio líquido com sorbitol.

Amostras/ Origem <sup>(1)</sup> /Tipo <sup>(2)</sup>	Estirpes	Meio líquido Glucose	Meio líquido Sorbitol	Meio CT-SMAC Sorbitol
A1/S/Ld	ZC 001			
	ZC 002			
	ZC 003			
A2/A/L	ZC 019			
	ZC 020			
	ZC 021			
	ZC 028			
A4/E/Est	ZC 053			
	ZC 054			
	ZC 057			
A5/E/Est	ZC 068			
	ZC 070			
	ZC 073			
	ZC 077			
	ZC 086			
A5/E/Est	ZC 091			
A3/S/Fsc	ZC 031			
	ZC 032			
	ZC 037			
	ZC 038			
	ZC 042			
	ZC 043			
A6/S/Fsc	ZC 096			
	ZC 097			
	ZC 099			
	ZC 106			
A7/S/Fsc	ZC 110			
	ZC 113			
	ZC 119			
A7/S/Fsc	ZC 120			
	ZC 128			
A8/S/Fsc	ZC 131			
	ZC 134			
	ZC 135			
	ZC 143			
	ZC 144			
A9/S/Fsc	ZC 155			
	ZC 160			
	ZC 162			
	ZC 163			
	ZC 167			

Figura 3.3: Resultados dos ensaios de crescimento das estirpes isoladas no meio líquido com glucose, no meio líquido com sorbitol em associação com os resultados no meio (CT-SMAC+MUG). <sup>(1)</sup> S: Suinicultura, A: Abate e processamento de carnes, E: Estrume. <sup>(2)</sup> Ld- Lama digerida, L- Lama, Est- Estrume bovino, Fsc- Fração sólida do chorume.

Legenda					
	Crescimento forte e rápido		Crescimento fraco		Sorbitol(+) FS
	Crescimento lento		Ausência de crescimento		Sorbitol(-) NFS

### 3.4. Actividade hemolítica

Amostras/Origem <sup>(1)</sup> /tipo <sup>(2)</sup>	Estirpes	Hemolisinas			Z	Sem hemólise
		$\alpha$	$\beta$	Ehx		
A1/S/Ld	ZC 001					
	ZC 002					
	ZC 003					
A2/A/L	ZC 019					
	ZC 020					
	ZC 021					
	ZC 028					
A4/E/Est	ZC 053					
	ZC 054					
	ZC 057					
	ZC 068					
A5/E/Est	ZC 070					
	ZC 073					
	ZC 077					
	ZC 086					
	ZC 091					
A3/S/Fsc	ZC 031					
	ZC 032					
	ZC 037					
	ZC 038					
	ZC 042					
A6/S/Fsc	ZC 043					
	ZC 096					
	ZC 097					
	ZC 099					
A7/S/Fsc	ZC 106					
	ZC 110					
	ZC 113					
	ZC 119					
A8/S/Fsc	ZC 120					
	ZC 128					
	ZC 131					
	ZC 134					
A9/S/Fsc	ZC 135					
	ZC 143					
	ZC 144					
	ZC 155					
	ZC 160					
	ZC 162					
	ZC 163					
	ZC 167					

Figura 3.4: Resultados obtidos das estirpes inoculadas no agar enterohemolisina.

<sup>(1)</sup> S: Suinicultura, A: Abate e processamento de carnes, E: Estrume. <sup>(2)</sup> Ld- Lama digerida, L- Lama, Est- Estrume bovino, Fsc- Fracção sólida do chorume.

Legenda			
	Produção de $\beta$ hemolisina	Não descrito	Sem hemólise

Analisando os resultados, oito estirpes não tiveram actividade hemolítica (Figura 3.4) e as restantes 29 estirpes, correspondendo a 70% do total, exibiram um fenótipo que não pode ser considerada hemólise (Figura 3.5) porque não se visualizaram halos nem lise celular. Fazendo uma análise comparativa entre as Figuras 3.5 e 3.6, é fácil reter as diferenças existentes entre elas. A estirpe da Figura 3.5 apresenta ausência de lise e com alterações na tonalidade do meio de cultura, enquanto que na Figura 3.6 o meio de cultura permanece inalterado com presença de colónias não hemolíticas. Esta característica (Figura 3.5) parece sugerir que houve provimento do ferro (por reacções de oxidação) mas sem actividade hemolítica, ou seja, sem a formação de halos e lise celular.

A análise dos resultados permite constatar que nenhuma das estirpes produziu a  $\alpha$ -hemolisina (Capítulo 2, Figura 2.9), visto que não houve crescimento de colónias entre as 3 e 6h de incubação como também não houve produção de enterohemolisina após 24h de incubação.



Figura 3.5: Estirpe ZC162 da A9 (Z) não descrito em termos de hemólise



Figura 3.6: Estirpe ZC144 da A8, sem hemólise

A Figura 3.7 mostra a hemólise por  $\beta$ -hemolisina que provoca lise completa do meio de cultura com halos grande e colónias brilhantes, e que ocorreu em quatro estirpes, três de origem suinícola (A3) e uma de estrume bovino (A4).



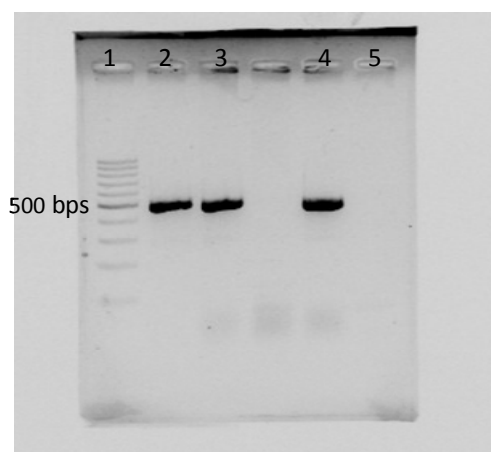
Figura 3.7: Estirpe ZC032 da A3 com produção de  $\beta$ -hemolisina

A detecção da produção da enterohemolisina é considerada um marcador epidemiológico para a identificação de potenciais VTEC/EHEC (Beutin *et al.*, 1995). A hemólise provocada por esta toxina traduz-se, morfológicamente, por halos pequenos e colónias turvas (Capítulo 2, Figura 2.10). Beutin *et al.* (1989) observaram uma clara associação entre estirpes produtoras de verotoxinas VTEC e a produção desta toxina, no entanto, nem todas as estirpes VTEC produzem enterohemolisina, e nem todas as estirpes produtoras de enterohemolisinas são VTEC como as estirpes EPEC atípicas do serogrupo O26, O69, O84 e O168. Note-se o facto de que o serótipo O157:H7 de *E. coli* EHEC sub grupo de VTEC, exibir o fenótipo enterohemolítico e o serótipo O157:H<sup>-</sup> de *E. coli* também EHEC não ser hemolítico (Schmidt e Benz 2003; Cookson *et al.*, 2007).

### 3.5. Pesquisa de genes de virulência por PCR

Na Figura 3.8 apresenta-se um exemplo de um resultado de uma reacção de PCR em gel de agarose (1,5%) na amplificação do gene *eaeA* com os *primers* FMV.

Como se pode verificar, o gel apresenta três bandas bem amplificadas sem dímeros de *primers* e sem produtos inespecíficos.



Legenda:

- 1- DNA ladder (100 bps),
- 2- *E. coli* O157:H7 (estirpe controlo) 471 bps
- 3- Estirpe ZC070
- 4- Estirpe ZC077
- 5- Controlo negativo

Figura 3.8: Exemplo de um resultado da amplificação do gene *eaeA* com os primers FMV

A Tabela 3.6 mostra os resultados da presença (+) e ausência (-) dos factores de virulência como as verotoxinas VT<sub>1</sub> e VT<sub>2</sub>, o gene *eaeA* que codifica para a intimina, as enterotoxinas termo estável STI e termo lábil LT, o plasmídeo EAF, o gene *ial* e a actividade hemolítica.

Tabela 3.6: Presença (+) e ausência (-) dos factores de virulência nas amostras estudadas

Amostras / Origem ( <sup>1</sup> ) / tipo ( <sup>2</sup> )	VT <sub>1</sub>	VT <sub>2</sub>	<i>eaeA</i>	STI	LT	EAF	<i>ial</i>	Hemolisinas (α, β, Ehx)
A1/S/L d	-	-	-	-	-	-	-	-
A2/A/L	-	-	-	-	-	-	-	-
A4/E/Est	-	-	-	-	-	-	-	+
A5/E/Est	+	-	+	-	-	-	-	-
A3/S/ Fsc	-	-	-	+	-	-	-	+
A6/S/ Fsc	-	-	+	-	-	-	-	-
A7/S/ Fsc	-	-	+	-	-	-	-	-
A8/S/ Fsc	-	-	-	-	-	-	-	-
A9/S/ Fsc	-	-	-	-	-	-	-	-

(<sup>1</sup>) S: Suinicultura, A: Abate e processamento de carnes, E: Estrume. (<sup>2</sup>) Ld- Lama digerida, L- Lama, Est- Estrume bovino, Fsc- Fracção sólida do chorume.

Os resultados apresentados indicam a detecção de factores de virulência em quatro no total de nove amostras estudadas, com maior ocorrência do gene codificador da intimina (*eaeA*) que se encontrou presente em três amostras. Salienta-se a amostra A5, estrume bovino, com a presença da verotoxina VT<sub>1</sub> e o gene *eaeA*, e a amostra A3, de uma suinicultura, com a presença da enterotoxina termo-estável STI em associação com actividade hemolítica.

Na tabela 3.7 apresenta-se a presença e ausência dos factores de virulência combinadas com o resultado no meio CT-SMAC+MUG e actividade hemolítica de cada estirpe.

Ao analisar a tabela é possível observar que não se evidenciam discordâncias na amplificação dos genes VT<sub>1</sub>, *eaeA* e VT<sub>2</sub>, em relação aos dois conjuntos de *primers* da OIE e FMV, pode-se concluir que ambos os conjuntos de *primers* funcionaram bem na pesquisa destes factores de virulência. O gene com maior frequência foi *eaeA* encontrado em seis estirpes, quatro de origem suínica e duas provenientes de amostras de estrume bovino. Para os genes que codificam para as toxinas VT<sub>2</sub>, LT, o plasmídeo EAF, e o gene *ial* todas as estirpes apresentaram resultados negativos. Os resultados mostram que, a produção de hemolisinas está associada a uma estirpe FS que parece não ser patogénica, e a três estirpes que apresentam o factor de virulência ST1, e são provenientes da mesma suinicultura (A3), duas FS e uma NFS.



Tabela 3.7: Presença e ausência dos factores de virulência das estirpes estudadas. A tabela também inclui os resultados das estirpes de controlo, resultados no meio CT-SMAC+MUG e a actividade hemolítica. (continua na página seguinte)

Estirpes Controlo <sup>(1)</sup>	Amostras / Origem <sup>(2)</sup> / Tipo <sup>(3)</sup>	CT-SMAC +MUG <sup>(4)</sup>	VT <sub>1</sub> Primers FMV	VT <sub>1</sub> Primers OIE	VT <sub>2</sub> Primers FMV	VT <sub>2</sub> Primers OIE	eaeA Primers FMV	eaeA Primers OIE	ST1	LT	EAF	IAL	Hemolisina (α, β, Ehx) Z <sup>(5)</sup> , Sem hemólise
<b>O157(DNA)</b>			+	+			+	+			-		
<b>E 57</b>		+			+	+			+				Sem hemólise
<b>1537</b>		+			+	-				+			Sem hemólise
<b>Estirpes</b>													
<b>ZC 001</b>	A1/S/Ld	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sem hemólise
<b>ZC 002</b>	A1/S/Ld	—	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z*
<b>ZC 003</b>	A1/S/Ld	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sem hemólise
<b>ZC 019</b>	A2/A/L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sem hemólise
<b>ZC 020</b>	A2/A/L	—	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z*
<b>ZC 021</b>	A2/A/L	—	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sem hemólise
<b>ZC 028</b>	A2/A/L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z*
<b>ZC 031</b>	A3/S/Fsc	—	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	β
<b>ZC 032</b>	A3/S/Fsc	—	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	β
<b>ZC 037</b>	A3/S/Fsc	—	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z*
<b>ZC 038</b>	A3/S/Fsc	—	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z*
<b>ZC 042</b>	A3/S/Fsc	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	β
<b>ZC 043</b>	A3/S/Fsc	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z*
<b>ZC 053</b>	A4/E/Est	—	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z*
<b>ZC 054</b>	A4/E/Est	—	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z*
<b>ZC 057</b>	A4/E/Est	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z*
<b>ZC 068</b>	A4/E/Est	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	β
<b>ZC 070</b>	A5/E/Est	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	Z*
<b>ZC 073</b>	A5/E/Est	—	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z*
<b>ZC 077</b>	A5/E/Est	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	Z*
<b>ZC 086</b>	A5/E/Est	—	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z*
<b>ZC 091</b>	A5/E/Est	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z*

Estirpes Controlo <sup>(1)</sup>	Amostras / Origem <sup>(2)</sup> / Tipo <sup>(3)</sup>	CT-SMAC +MUG <sup>(4)</sup>	VT <sub>1</sub> Primers FMV	VT <sub>1</sub> Primers OIE	VT <sub>2</sub> Primers FMV	VT <sub>2</sub> Primers OIE	eaeA Primers FMV	eaeA Primers OIE	ST1	LT	EAF	IAL	Hemolisina (α, β, Ehx) Z <sup>(5)</sup> , Sem hemólise
ZC 096	A6/S/Fsc	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z*
ZC 097	A6/S/Fsc	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z*
ZC 099	A6/S/Fsc	—	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z*
ZC 106	A6/S/Fsc	—	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	Sem hemólise
ZC 110	A7/S/Fsc	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	Sem hemólise
ZC 113	A7/S/Fsc	—	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	Z*
ZC 119	A7/S/Fsc	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	Z*
ZC 120	A7/S/Fsc	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z*
ZC 128	A8/S/Fsc	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sem hemólise
ZC 131	A8/S/Fsc	—	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z*
ZC 134	A8/S/Fsc	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z*
ZC 135	A8/S/Fsc	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z*
ZC 143	A8/S/Fsc	—	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z*
ZC 144	A8/S/Fsc	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sem hemólise
ZC 155	A8/S/Fsc	—	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z*
ZC 160	A9/S/Fsc	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z*
ZC 162	A9/S/Fsc	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z*
ZC 163	A9/S/Fsc	—	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z*
ZC 167	A9/S/Fsc	—	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Z*

<sup>(1)</sup> Estirpes de controlo: O157(DNA), E57 e 1537. <sup>(2)</sup> S: Suinicultura, A: Abate e processamento de carnes, E: Estrume. <sup>(3)</sup> Ld- Lama digerida, L- Lama, Est- Estrume bovino, Fsc- Fracção sólida do chorume. <sup>(4)</sup> Resultados em CT-SMAC+MUG (+) FS e (-) NFS. <sup>(5)</sup> Z: Morfologia não descrita.

#### Legenda

	Estirpes onde foram detectados factores de virulência e/ou toxinas hemolíticas
--	--

No conjunto das 41 estirpes, 10 estirpes apresentam factores de virulência, correspondendo a 24,4%, e 31 estirpes sem presença de genes de virulência correspondem a 75,6% do total. O conjunto das 31 estirpes sem presença de factores de virulência, 14 estirpes são NFS (45,2%) e 17 estirpes são FS (54,8%). Geralmente, as estirpes NFS estão associadas à presença de factores de virulência. Analisando o meio de cultura CT-SMAC+MUG, embora seja muito selectivo, está documentado o crescimento neste meio de espécies bacterianas *Gram negativas* diferentes de *E. coli*, como *Pseudomonas* spp, outro género da *Escherichia* como a *E. hermannii*. Também não diferencia as estirpes patogénicas SF do serogrupo EHEC não-O157 como o serótipo O157:H<sup>-</sup> que não cresce neste meio (Nataro e Kaper, 1998; Fujisawa *et al.*, 2001; Müller e Ehlers, 2004; Aitken *et al.*, 2007; Chassagne *et al.*, 2009). Seria útil usar meios de cultura combinados ou utilizar outros meios disponíveis no mercado mas mais dispendiosos, como o Rainbow agar O157, CHROMagar, Fluorocult agar, BCM agar entre outros (LeJeune *et al.*, 2006; Church *et al.*, 2007; Hara-Kudo *et al.*, 2007; O'Sullivan *et al.*, 2007). Para a caracterização destas estirpes NFS sem factores de virulência seria vantajoso a pesquisa de outros factores patogénicos que não foram estudados (Blanco *et al.*, 2004). Neste contexto, pode-se mencionar um estudo onde se isolaram *E. coli* O157, FS, com ausência das toxinas VT<sub>1</sub> e VT<sub>2</sub>. Os serótipos foram confirmados por amplificação dos antígenos flagelares e somáticos fliC<sub>H7</sub>, e rfb<sub>O157</sub>, respectivamente o que sugere que a expressão de VTx pode não ser suficiente para lhes conferir virulência, mas sim uma associação de factores de virulência uns bem identificados e outros ainda por caracterizar (Cobbaut *et al.*, 2009). Seguidamente, a Tabela 3.8 apresenta a síntese dos resultados das estirpes com factores de virulência, origem, tipo, características morfológicas e genéticas e potenciais patótipos de virulência.

Tabela 3.8: Síntese dos resultados das estirpes estudadas potencialmente patogênicas: a sua origem e tipo, as características morfológicas e genéticas, e potenciais patotipos de virulência

Amostra	Origem <sup>(1)</sup> / Tipo <sup>(2)</sup>	Estirpes	CT- SMAC+MUG <sup>(3)</sup>	Factores de virulência	Hemolisina <sup>(4)</sup>	Potenciais patotipos <i>E. coli</i>
A3	S/Fsc	ZC 031	–	STI	β	ETEC
A3	S/Fsc	ZC 032	–	STI	β	ETEC
A3	S/Fsc	ZC 042	+	STI	β	ETEC
A4	E/Est	ZC 068	+		β	
A5	E/Est	ZC 070	+	VT <sub>1</sub> + <i>eaeA</i>	Z	EHEC não- O157
A5	E/Est	ZC 077	+	<i>eaeA</i>	Z	EPECa
A6	S/Fsc	ZC 106	–	<i>eaeA</i>	Sem hemólise	EPECa
A7	S/Fsc	ZC 110	+	<i>eaeA</i>	Sem hemólise	EPECa
A7	S/Fsc	ZC 113	–	<i>eaeA</i>	Z	EPECa
A7	S/Fsc	ZC 119	+	<i>eaeA</i>	Z	EPECa

<sup>(1)</sup> S- Suinicultura, E- Estrume. <sup>(2)</sup> Fsc- Fracção sólida do chorume, Est- Estrume. <sup>(3)</sup> (NFS) –; (FS) +. <sup>(4)</sup> Z- Não descrito.

As estirpes **ZC031**, **ZC032** e **ZC042** enquadram-se potencialmente no patotipo ETEC. A incapacidade de fermentar o sorbitol é uma propriedade característica de estirpes de *E. coli* EHEC, contudo, têm sido identificadas estirpes de outros patotipos com este fenótipo, nomeadamente ETEC, EPEC e EIEC. Os resultados obtidos estão de acordo com um trabalho Ojeda *et al.* (1995) que detectaram estirpes NFS pertencentes ao patotipo ETEC. A β-hemolisina é um agente etiológico muito comum presente em isolados de leitões neonatais e no pós-desmame (Bischoff *et al.*, 2002). Estirpes ETEC são implicadas em diarreias severas nos animais entre os quais os suínos causando baixas significativas na produção animal. Como têm factores de colonização muito específicos, as estirpes ETEC isoladas de animais não estão normalmente, associadas a patologias nos seres humanos (Qadri *et al.*, 2005). A estirpe **ZC068** não revela presença de factores de virulência associados excepto para a produção de β-hemolisina, os resultados parecem apontar para uma estirpe comensal, visto faltar uma apropriada combinação de factores para adquirir virulência (Chapman *et al.*, 2006). Os resultados obtidos sugerem que a estirpe **ZC070** (A5) poderá pertencer ao serogrupo de *E. coli* EHEC não-O157. Em muitos casos, é frequente estirpes isoladas de gado bovino produzirem só a VT<sub>1</sub> em relação às

verotoxinas (Mainil e Duabe, 2005). O facto de ser FS e não produzir a toxina enterohemolisina não afasta a hipótese de ser, provavelmente, uma estirpe EHEC. Uma grande percentagem de estirpes dos serogrupos O26, O103, O111 e O145 são FS, não produzem a enterohemolisina, são EHEC não-O157 e têm sido implicadas recentemente em patologias graves no homem, particularmente no continente Europeu (Bielaszewska e Karch 2001; Mainil e Daube, 2005). As estirpes **ZC077** e **ZC070** foram isoladas da mesma amostra. Relativamente à estirpe **ZC077** os resultados apontam para uma associação desta estirpe ao patotipo de EPEC atípica pois não é produtora de verotoxinas. As estirpes **ZC106**, **ZC110**, **ZC113** e **ZC119**, pelos factos de serem negativas para VTx e para o plasmídeo EAF e apenas apresentarem o gene *eaeA*, indica-se uma associação ao patotipo de *E. coli* EPEC atípicas. Neste conjunto de quatro estirpes identificaram-se estirpes NFS e FS. No que respeita à capacidade de fermentação do sorbitol, o fenótipo das duas estirpes NSF enquadra-se num trabalho de Ojeda *et al.* (1995) onde identificaram estirpes ETEC NFS em estirpes humanas isoladas de pacientes com infecções. As estirpes EPEC atípicas estão associadas às estirpes EHEC nas características genéticas, nos serótipos, no habitat natural e noutros aspectos epidemiológicos (Trabulsi *et al.*, 2002). Estirpes EPEC atípicas são a causa de diarreias em leitões com elevadas taxas de mortalidade (Oswald *et al.*, 2000). O reservatório principal das estirpes EPEC típicas é o homem, enquanto para as EPEC atípicas, como são frequentemente detectadas no meio ambiente pensa-se que o homem e animais de várias espécies, entre os quais os suínos, possam ser o seu habitat natural. A distribuição e o reservatório das estirpes EPEC estão pouco estudados (Ishii *et al.*, 2007).

#### 3.5.1. Sequenciação

Foi enviado para sequenciação o produto da amplificação *eaeA* da estirpe ZC106. Utilizou-se o programa BLAST para confirmação que o produto amplificado corresponde ao gene de interesse. Apresenta-se na tabela 3.9 as primeiras cinco sequências representativas do resultado do BLAST.

Tabela 3.9: Estirpe, gene sequenciado, e sequências com homologia.

Estirpe	Sequência com Identidade	Código	Identidade (%) <sup>(2)</sup>	Valor de E <sup>(3)</sup>
ZC 106 - <i>eaeA</i>	<i>E. coli</i> O111:H- str. 11128, DNA, genoma completo	AP010960.1	100	0
496 <sup>(1)</sup>	<i>E. coli</i> locus of enterocyte effacement (LEE), strain DEC8A	FM986650.1	100	0
	<i>E. coli</i> gene eae para intimina THETA-2, eae-THETA-2 allele, estirpe 1871-1	FM872418.1	100	0
	<i>E. coli</i> O55:H7 gene eae para Intimina theta, completo cds, estirpe st58	AB334564.1	100	0
	<i>E. coli</i> O55:H7 gene eae para intimina theta, completo cds, estirpe: WC416	AB334563.1	100	0

<sup>(1)</sup> Número de nucleótidos analisados. <sup>(2)</sup> Percentagem de nucleótidos iguais no alinhamento. <sup>(3)</sup> Probabilidade da semelhança observada por acaso.

---

### CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

---

#### 4.1. Considerações finais

No presente estudo foram caracterizadas nove amostras de resíduos de produção animal do ponto de vista microbiológico e físico-químico. As características físico-químicas destes resíduos conferem-lhes interesse agronómico, mas o seu elevado teor em água, ausência de estrutura, heterogeneidade e odor desagradável, dificultam a sua aplicação na agricultura.

Em relação aos resultados obtidos na caracterização microbiológica, estes resíduos suscitam algumas preocupações a nível ambiental. Quantitativamente, a ocorrência de *E. coli* foi muito elevada, ultrapassando o limite estipulado pelo Decreto-Lei nº 276/2009 e pelo Working Document on Sludge (2000), documentos que regulamentam a aplicação de lamas na agricultura. Além disso, foram detectados factores de virulência característicos dos patótipos de *E. coli* ETEC, EHEC não-O157 e EPEC atípicas em quatro das nove amostras de resíduos de produção animal. De entre as estirpes isoladas com factores de virulência, a estirpe associada ao patótipo EHEC não-O157, isolada de estrume bovino, é a que causa maior preocupação ao nível da saúde pública, devido à sobrevivência, fácil disseminação e transmissão aos seres humanos (Nataro e Kaper, 1998).

Os resultados sugerem que não existe semelhança entre a origem, constituição físico-química das amostras, origem geográfica, e a detecção de estirpes com factores de virulência. Na amostra A3 (suinicultura), obtida da fracção sólida do chorume, foram detectados factores de virulência, enquanto que nas amostras A8 e A9 (suiniculturas), com constituição semelhante, não se detectaram factores de virulência. Na amostra de estrume bovino A5 foram isoladas duas estirpes, uma associada ao patótipo EHEC não-O157 e outra associada a EPEC atípica, enquanto que na A6 (suinicultura) de outra

origem, foi detectada uma estirpe também associada a EPEC atípica. Nas amostras A1, A2 e A4 não se detectaram factores de virulência. Estes resultados podem possivelmente, ter a influência de um conjunto de factores que incluem o número dos animais em espaços confinados de diferentes idades, alterações na dieta, a sazonalidade e movimentação dos animais (Nicholson *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2009).

Analizados globalmente os resultados sugerem que os resíduos de produção animal apresentam risco microbiológico. As quatro amostras com presença de estirpes com factores de virulência apresentam um risco superior enquanto que as amostras A1, A2, A4, A8 e A9 aparentemente terão um risco microbiológico mais reduzido. Face a estes resultados, não é recomendável a aplicação directa na agricultura destes resíduos de produção animal sem tratamentos destinados a minimizar possíveis problemas de contaminações ambientais e de saúde pública. Há autores que sugerem que o armazenamento de estrumes e chorumes durante um determinado período de tempo permite a redução do risco microbiológico. Contudo, devido à persistência de algumas estirpes patogénicas de *E. coli*, este processo poderá não ser suficiente (Nicholson *et al.*, 2005; Peterson *et al.*, 2007; Duriez *et al.*, 2008). Existem vários processos de tratamento recomendados para o tratamento de resíduos de produção animal entre os quais a compostagem que, quando conduzida de um modo adequado, permite a destruição dos microrganismos, a redução da libertação de odores e melhoria das características físico-químicas do composto (Turner, 2002; Westerman e Bicudo, 2005). Outro processo de tratamento dos resíduos de produção animal é a digestão anaeróbia, que é um sistema biológico que opera na ausência de oxigénio com transformação da matéria orgânica em biogás. A integração deste sistema nos planos de tratamento de efluentes de explorações agro-pecuárias é vantajosa, no sentido em que a produção de biogás pode ser utilizada nas instalações e/ou vendida para o exterior (Tanski-Heinonen *et al.*, 2006).



#### 4.2. Perspectivas futuras

A agropecuária e as agro-indústrias são as actividades económicas mais significativas em algumas das regiões do nosso País. Estas actividades geram diariamente elevadas quantidades de resíduos orgânicos que por terem interesse agrícola, são regularmente aplicados ao solo. Futuramente, seria importante a realização de outros estudos de caracterização físico-química e microbiológica de resíduos orgânicos de explorações agropecuárias similares mas em maior escala, com maior duração e com uma maior área geográfica abrangida. Seria vantajoso também, otimizar e complementar a caracterização fenotípica e genética de *E. coli* com a aplicação de outros meios de cultura selectivos, testes adicionais de serotipagem no sentido de aprofundar o conhecimento sobre a distribuição e características das estirpes potencialmente patogénicas desta bactéria.

---

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Aitken, M., Sobsey, N., Van Abel, A. N., Blauth, E. K., Singleton, R. D. Crunk, L. P., Nichols, C., Walters, W. G., Schneider, M. (2007). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 during thermophilic anaerobic digestion of manure from dairy cattle. *Water Research*, 41: 1659-1666.
- ASM Microlibrary (2010). Imagem da produção de  $\alpha$ -Hemolisina. <http://www.microbelibrary.org/>  
Site acessado em Julho 2010.
- Avery, L. M., Killham, K., Jones, D. L. (2005). Survival of *E. coli* O157:H7 in organic wastes destined for land application. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 814-822.
- Avery, L. M., Williams, P. A., Killham, K., Jones, D. L. (2009). Heat and lime-treatment as effective control methods for *E. coli* O157:H7 in organic wastes. *Bioresource Technology*, 100: 2692-2698.
- Bettelheim, A. K., Beutin, L. (2003). A rapid laboratory identification and characterization of verocytotoxigenic (shiga toxin producing) *Escherichia coli* (VTEC/STEC). *Journal of Applied Microbiology*, 95: 205-217.
- Beutin, L., Montenegro, M. A., Orskov, I., Orskov, F., Prada, J., Zimmermann, S., Stephan, R. (1989). Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 27: 2559-2564.
- Beutin, L. (1991). The different hemolysins of *Escherichia coli*. *Medical Microbiology and Immunology*, 180: 167-182.
- Beutin, L., Geier, D., Zimmermann, S., Karch, H. (1995). Virulence markers of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* strains originating from healthy domestic animals of different species. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 631-635.
- Beutin, L., Zimmermann, S., Gleier, K. (1996). Rapid detection and isolation of shiga-like toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* by direct testing of individual enterohemolytic colonies from washed sheep blood agar plates in the VTEC-RPLA assay. *Journal of Clinical*

*Microbiology*, 34: 2812-2814.

- Beutin, L., Steinrück, H., Krause, G., Steege, K., Haby, S., Hultsch, G., Appel, B. (2007). Comparative evaluation of the Ridascreen Verotoxin enzyme immunoassay for detection of Shiga-toxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and other sources. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 630-639.
- Bicudo, R. J., e Goyal, M. S. (2003). Pathogens and manure management systems: A review. *Environmental Technology*, 24: 115-130.
- Bielaszewska, M., e Karch, H. (2001). Non-O157:H7 shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* strains: epidemiological significance and microbiological diagnosis. *Wold Journal of Clinical Microbiology*, 16: 711-718.
- Bischoff, M. K., White, G., D., McDermott, F. P., Zhao, S., Gaines, S., Maurer, J. J., Nisbet, J. D., (2000). Characterization of chloramphenicol resistance in beta-hemolytic *Escherichia coli* associated with ciarrhea in neonatal swine. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 389-394.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Gonzalez, E. A., Mora, A., Jansen, W., Gomes, T. A. T., Zerbini, L., F., Yano, T., Pestana de Castro, A. F., Blanco, J. (1997). Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 2958-2963.
- Blanco, M. I., Padola, N. L., Krüger, A., Sanz, M. E., Blanco, J. E, González, E. A., Dahbi, G., Mora, A., Bernárdez, M., I., Etcheverría, A. I., Arroyo, G. H., Lucchesi, P. M. A., Parma, A. E., Blanco, J. (2004). Virulence genes and intimin types of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle and beef products in Argentina. *International Microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 7: 269-276.
- BLAST Basic Local Alignment Search Tool. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Site acedido em Junho 2010.
- Boehm, D. F., Welch, R. A., Snyder, I. S. (1990). Domains of *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) involved in binding of calcium and erythrocyte membranes. Domains of *Escherichia coli* Hemolysin (HlyA) Involved in Binding of Calcium and Erythrocyte Membranes. *Infection and Immunity*, 58: 1959-1964.
- Bouvet, J. Montet, P. M., Rossel, R., Le Roux, A., Bavai, C., Ray-Gueniot, S., Mazury, C., Atrache, V., and Vernozzy-Rozand, C. (2002). Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) and

*E. coli* O157:H7 in French pork. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 7-14.

- Boczek, L. A. (2005). The Widespread Occurrence of the Enterohemolysin Gene ehly Among Environmental Strains of *Escherichia coli*. Master of Science in the Department of Biological Sciences of the College of Arts and Sciences Division of Graduate Studies and Research of the University of Cincinnati.
- Breum, S. Ø. e Boel, J. (2010). Prevalence of *Escherichia coli* O157 and verocytotoxin producing *E. coli* (VTEC) on Danish beef carcasses. *International journal of Food Microbiology*, 141: 90-96.
- Calouro, F. (2005). Actividades Agrícolas e Ambiente. SPI Sociedade Portuguesa de Inovação Consultadoria Empresarial e Fomento de Inovação. 1ª Edição Porto.
- Chapman, P. A., Siddons, C. A., Zadik, P. M., Jewes, L. (1991). An improved selective medium for the isolation of *Escherichia coli* O157. *Journal of Medical Microbiology*, 35: 107-110.
- Chapman, P. A. (1995). Verotocytotoxin-producing *Escherichia coli*: an overview with emphasis on the epidemiology and prospects for control of *E. coli* O157. *Food Control*, 6: 187-193.
- Chapman, T. A., Wu, X.-Y., Barchia, I., Bettelheim, K. A., Driesen, S., Trott, D., Wilson, M., Chin, J. J.-C. (2006). Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 4782-4795.
- Chart, H., Jenkins, C., Smith, R. J., Hedges, D., Rowe, B. (1998). Haemolysin production by strains of Verotocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Microbiology*, 144: 103-107.
- Cobbaut, K., Houf, K., Buvens, G., Habib, I., De Zutter, L. (2009). Occurrence of non-sorbitol fermenting, verocytotoxin-lacking *Escherichia coli* O157 on cattle farms. *Veterinary Microbiology*, 138: 174-178.
- Constantiniu, S. (2002). Emerging Shiga cytotoxin-producing *Escherichia coli*. *The Journal of Preventive Medicine*, 10: 62-78.
- Cookson, A. L., Bennett, J., Thomson-Carter, F., Attwood, G. T. (2007). Molecular subtyping and genetic analysis of the enterohemolysin gene (ehxA) from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 6360-6369.
- Cortés, C., De la Fuente, R., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Dhahi, G., Mora, A., Justel, P., Contreras, A., Sánchez, A., Corrales, J. C., Orden, J. A. (2005). Serotypes, virulence genes and intimin types of verotoxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* isolated

from healthy dairy goats in Spain. *Veterinary Microbiology*, 110: 67-76.

Decreto-Lei N° 214 / 2008. REAP. Regime do Exercício da Actividade Pecuária.

Decreto-Lei N° 276 / 2009 de 2 de Outubro de 2009. Regime jurídico da utilização agrícola das lamas de depuração.

Duan, H., Chai, T., Liu, J., Zhang, X., Qi, C., Gao, J., Wang, Y., Cai, Y., Miao, Z., Yao, M., Schlenker, G. (2009). Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environmental Research*, 109: 511-517.

Duffy, G. (2003). Verocytotoxic *Escherichia coli* in animal faeces, manure and slurries. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 94S-103S.

Duriez, P., Zhang, Y., Lu, Z., Scott, A., Topp, E. (2008). Loss of virulence genes in *Escherichia coli* populations during manure storage on a commercial swine farm. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 3953-3942.

EFSA. (2007) Monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. *European Food Safety Authority*.

EN 12176 (1998) European Standard. Characterization of sludges. Determination of pH-value.

EN 12879 (2000) European Standard. Characterization of sludges. Determination of the loss on ignition of dry mass.

EN 12880 (2000) European Standard. Characterization of sludges. Determination of dry residue and water content.

EN 13342 (2000) European Standard. Characterization of sludges. Determination of Kjeldahl nitrogen.

EN 13346 (2000) European Standard. Characterization of sludges. Determination of traces elements and phosphorus- Aqua regia extraction methods.

Erume, J., Berberov, E., M., Kachman, S., D., Scott, M., A., Zhou, Y., Francis, D., H., Moxley, R., A. (2008). Comparison of the contributions of heat-labile enterotoxin and heat-stable enterotoxin to the virulence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in F4ac receptor positive young pigs. *Infection and Immunity*, 76: 3141-3149.

FAO (2006). Livestock's Long Shadow Environmental Issues and Option. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Part II. Rome.

- FDA (2002) U.S. Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual, Chapter 4.
- Feng, P., Fields, P. I., Swaminathan, B., Whittam, T. S. (1996). Characterization of nonmotile variants of *Escherichia coli* O157 and other serotypes by using an anti-flagellin monoclonal antibody. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 2856-2859.
- Féria, C., Machado, J., Duarte Correia, J., Gonçalves, J., Gastra, W. (2001). Distribution of papG alleles among uropathogenic *Escherichia coli* isolated from different species. *FEMS Microbiology Letters*, 202: 205-208.
- Fernández, D., Rodríguez, E. M., Arroyo, G. H, Padola, N. L., Parma, A. E. (2009). Seasonal variation of Shiga toxin-encoding genes (stx) and detection of *E. coli* O157 in dairy cattle from Argentina. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 1260-1267.
- Fonseca de Sousa, J. C. (2000). Capítulo 8, *Enterobacteriaceae*, p. 99-109, in: *Microbiologia*, Volume 2. Edição Lidel- Edições técnicas, Lda.
- Foster, G, Hopkins, G. F., Gunn, G. J, Ternent, H. E., Thomson-Carter, F., Knight, H. I., Graham, D. J., L., Edge, V., Synge, B. A. (2003). A comparison of two pre-enrichment media prior to immunomagnetic separation for the isolation of *E. coli* from bovine faeces. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 155-159.
- Frankel, G, Phillips, A. D., Rosenshine, I., Dougan, G., Kaper, J. B., Knutton, S. (1998). Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Molecular Microbiology*, 30: 911-921.
- Freitas da Fonseca, A. (1998). Capítulo 2, Taxonomia Microbiana, p. 13-18, in: *Microbiologia*, Volume 1. Edição Lidel- Edições técnicas, Lda.
- Fujisawa, T., Sata, S., Aikawa, K., Takahashi, T., Yamai, S., Shimada, T. (2001). Modification of sorbitol MACConkey medium containing cefixime and tellurite for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from radish sprouts. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 3117-3118.
- Garcia, M. C., Szogi, A. A., Vanotti, M. B., Chastain, J. P., Millner, P. D. (2009). Enhanced solid-liquid separation of dairy manure with natural flocculants. *Bioresearch Technology*, 100: 5417-5423.
- García-Aljaro, C., Muniesa, M., Blanco, J., E., Blanco, M., Blanco, J., Jofre, J., Blanch, A. R. (2005). Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. *FEMS Microbiology Letters*, 246: 55-65.
- Gerba, C. P. e Smith, J. E. (2005). Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land

application of wastes. *Journal of Environmental Quality*, 34: 42-48.

Gonçalves, M. S. (2005). *Gestão de Resíduos Orgânicos*. SPI. Sociedade Portuguesa de Inovação Consultadoria Empresarial e Fomento de Inovação. 1ª Edição Porto.

Guan, T. Y. e Holley, R. A. (2003). Pathogen Survival in manure environments and transmission of human enteric illness. A review. *Journal of Environmental Quality* 32: 383-392.

Gunn, G. J., McKendrick, I. J., Ternent, H. E., Thomson-Carter, F., Foster, G., Synge, B. A. (2007). An investigation of factors associated with the prevalence of verocytotoxin producing *Escherichia coli* O157 shedding in Scottish beef cattle. *The Veterinary Journal*, 174: 554-564.

Gunzburg, T. S., Tornieporth, G. N., Riley, W. L. (1995). Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 1375-1377.

Gyles, C., Johnson, R. Gao, A., Ziebell, K. I. M., Pierard, D. (1998). Association of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin with serotypes of *Escherichia coli* of humans and bovine origins. *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 4134-4141.

Gyles, C. L. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of Animal Science*, 85: 45-62.

Hara-Kudo, Y., Konishi, N., Ohtsuka, K., Hiramatsu, R., Tanaka, H., Konuma, H., Takatori, K. (2008). Detection of Verotoxigenic *Escherichia coli* O157 and O26 in food by plating methods and LAMP method: a collaborative study. *International Journal of Food Microbiology*, 122: 156-161.

Heinonen-tanski, H., Mohaibes, M., Karinen, P., Koivunen, J. (2006). Methods to reduce pathogens microorganisms in manure. *Livestock Science*, 102: 48-255.

Hjorth, M., Christensen, K. V., Christensen, M. L., Sommer, S. G. (2009). Solid-liquid separation of animal slurry in theory and practice. *Agronomy for Sustainable Development*, 30: 153-180.

Hutchison, M. L., Walters, L. D., Avery, S. M., Munro, F., Moore, A. (2005). Analyses of livestock production, waste storage, and pathogen levels and prevalences in farm manures. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 1231-1236.

Ishii, S., Meyer, K. P., Sadowsky, M. J. (2007). Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 5703-5710.

- Islam, M., Doyle, M. P., Phatak, S. C., Millner, P., Jiang, X. (2005). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on carrots and onions grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. *Food Microbiology*, 22: 63-70.
- Jaeger, J. e Acheson, D. (2000). Shiga toxin–producing *Escherichia coli*. *Current Infectious Disease Reports*, 2: 61-67.
- Jerram, L. (2010). Reprodução de E. coli. Imagem da capa. Site disponível. <http://www.lukejerram.com/> Site acedido em Julho de 2010.
- Kaper, B. J., Nataro, P. J., Mobley, T. L. H. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews/Microbiology*, 2: 123-140.
- Karmali, M. A. (2004). Infection by shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infection*, 26: 117-122.
- Karmali, M. A., Gannon, V., Sargeant, J. M. (2009). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology*, 140: 360-370.
- Lahti, E., Keskimäki, M., Rantala, L., Hyvönen, P., Siitonen, A., Honkanen-Buzalski, T. (2001). Occurrence of *Escherichia coli* O157 in finish cattle. *Veterinary Microbiology*, 79: 239-251.
- Larney, F. J., Yanke, L. J., Miller, J. J., McAllister, T. A. (2003). Fate of coliform bacteria in composted beef cattle feedlot manure. *Journal of Environmental Quality*, 32: 1508-1515.
- Law, D. (2000). Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 729-745.
- LeJeune, J. T, Besser, T. E., Rice, D. H., Hancock, D. D. (2001). Methods for the isolation of water-borne *Escherichia coli* O157. *Letters in Applied Microbiology*, 32: 316-320.
- Li, A. (2010). Imagem de *E. coli*. National University of Singapore. <http://w-uh.com/posts/030101-w-uh.html> Site acedido em Agosto de 2010.
- Madigan, T. M., Martinko, M. J., Dunlao, V. P., Clark, P. D. (2005). Chapter 5, Nutrition, culture and metabolism and microorganisms, in: *Biology of Microorganisms*. Twelfth Edition. Pearson Benjamin Cummings.
- Mainil, J. (1999). Shiga/Verocytotoxins and shiga/verotoxigenic *Escherichia coli* in animals. *Veterinary Research*, 30: 235-257.
- Mainil, G. J. e Daube, G. (2005). Verotoxingenic *Escherichia coli* from animals, humans and food's: who's who?. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 1332-1344.



- Maza, L., Pezzlo, T. M., Shigei T. J., Perteson, M. E., (2004). Chapter 10, Introduction to *Enterobacteriaceae*, in: *Color Atlas of Medical Bacteriology*. ASM Press.
- Mellies, J. L., Barron, A., M. S., Carmona, A. M. (2007). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Infection and Immunity*, 75: 4199-4210.
- Meng, J., Zhao, S., Doyle, M. P. (1998). Virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from food, animals and humans. *International Journal of Food Microbiology*, 45: 229-235.
- Mukherjee, A., Speh, D., Dyck, E., Diez-Gonzalez, F. (2004). Preharvest evaluation of coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7 in organic and conventional produce grown by Minnesota farmers. *Journal of Food Protection*, 67: 894-900.
- Mukherjee, A., Cho, S., Scheftel, J., Jawahir, S., Smith, K., Diez-Gonzalez, F. (2006). Soil survival of *Escherichia coli* O157:H7 acquired by a child from garden soil recently fertilized with cattle manure. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 429-436.
- Müller, E. E., Ehlers, M. M. (2004). Biologic identification of non-sorbitol fermenting bacteria isolated on *E. coli* O157 selective CT-SMAC agar. *Water S.A.*, 31: 247-251.
- Müller, D., Hagedorn, P., Brast, S., Heusipp, G., Bielaszewska, M., Friedrich, A. W., Karch, H., Schmidt, M. A. (2006). Rapid identification and differentiation of a clinical isolates of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), atypical EPEC, and shiga toxin-producing *Escherichia coli* by a one-Step multiplex PCR method. *Journal of Clinical Microbiology*, 44: 2626-2629.
- Nataro, J. P., Kaper, J., B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11: 142-201.
- Nicholson, F. A., Chambers, J. B., Williams, R. J., Unwin, J. R., (1999). Heavy metal contents of livestock feeds and animal manures in England and Wales. *Bioresource Technology*, 70: 23-31.
- Nicholson, F. A., Groves, J. S., Chambers, J. B. (2005). Pathogens survival during livestock manure storage and following application. *Bioresource Technology*, 96: 135-143.
- Oenema, O., Oudendag, D., Velthof, L. G., (2007). Nutrient losses from manure management in the European Union. *Livestock Science*, 112: 261-272.
- OIE (2009). Chapter 2.10.13, Verocytotoxigenic *Escherichia coli*, in: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. World Organization for Animal Health.
- Ojeda, A., Prado, V., Martinez, J., Arellano, C., Borczyk, A., Johnson, W., Lior, H., Levine, M. M.

- (1995). Sorbitol-negative phenotype among Enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of different serotypes and from different sources. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 2199-2201.
- O'Sullivan, J., Bolton, J. D., Duffy, G., Baylis, C., Tozzoli, R., Wasteson, Y., Lofdahl, S. (2007). Methods for detection and molecular characterization of pathogenic *Escherichia coli*. Pathogenic *Escherichia coli* Network PEN.
- Oswald, E., Schmidt, H, Morabito, S., Karch, H, Marchès, O., Caprioli, A. (2000). Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* characterization of a new intimin variant. *Infection and Immunity*, 68: 64-71.
- Pampulha, M. E. (1998). Capítulo 6, Nutrição e Crescimento de Microrganismos, p. 81-98, in: *Microbiologia Volume 1*. Edição Lidel- Edições técnicas, Lda.
- Parente, A., M. F. de Sousa, J. C. (1998). Capítulo 3, Características Morfológicas e Ultraestruturais dos Microrganismos Procariotas, p. 19-51, in: *Microbiologia, Volume 1*. Edição Lidel- Edições técnicas, Lda.
- Paton, A. W., Paton, J. C. (1998a). Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfb*<sub>O111</sub>, and *rfb*<sub>O157</sub>. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 598-602.
- Paton, J. C., Paton, A., W. (1998b). Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical microbiology Reviews*, 11: 450-479.
- Peixoto, A. M. (2006). Estudo dos factores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* isolados de suínos diagnosticados com colibacilose por técnicas de PCR e multiplex PCR. Relatório de Estágio. Faculdade de Medicina Veterinária/Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia.
- Peu, P., Bruge, H., Pourcher, A. M., Kérourédon, M., Godon, J. J., Delgenès, J. P., Dabert, P. (2006). Dynamics of a pig slurry microbial community during anaerobic storage and management. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 3578-3585.
- Petersen, S. O., Sommer, S. G., Beline, F., Burton, C., Dach, J., Dourmad, J. Y., Leip, A., Misselbrook, T., Nicholson, F., Poulsen, H. D., Provolò, G., Sorensen, P., Vinneras, B., Weiske, A., Bernal, M.-P., Böhm, R., Juhasz, C., Mihelic, R. (2007). Recycling of livestock manure in a whole-farm perspective. *Livestock Science*, 112: 180-191.

- Pourcher, A-M., Morand, P., Picard-Bonnaud, F., Billaudel, S., Monpoeho, S., Federighi, M., Ferré V., Moguedet, G. (2005). Decrease of enteric micro-organisms from rural sewage sludge during their composting in straw mixture. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 528-539.
- Qadri, F., Svennrholm, A. M., Faruque, A. S. G., Bradley Sack, R. (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clinical Microbiology Reviews*, 18: 465-483.
- RAMIRAN (2002). FAO European Cooperative Research Network. Recycling of agriculture, municipal and industrial residues in agriculture. Proceedings of the 10<sup>th</sup> International Conference of the RAMIRAN Network.
- Ravva, S. V., Sarreal, C. Z., Duffy, B., Stanker, L. H. (2006). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in wastewater from dairy lagoons. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 891-902.
- Schmidt, H, Beutin, L, Karch, H. (1995). Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infection and Immunity*, 63: 1055-1061.
- Schmidt, H., Karch, H. (1996). Enterohemolytic phenotypes and genotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 strains from patients with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 2364-2367.
- Schmidt, H., Benz, R. (2003). Detection and characterization of EHEC-hemolysin, in: *E. coli* shiga toxin methods and protocols. *Methods in Molecular Medicine*, 73: 151-163.
- Scotland, S. M., Cheasty, T., Thomas, A., Rowe, B. (1991). Beta-glucuronidase activity of vero cytotoxin-producing strains of *Escherichia coli*, including serogroup O157, isolated in the United Kingdom. *Letters in Applied Microbiology*, 13: 42-44.
- Silveira, A., Centeno, M. S. L., Queda, A. C. C. (2005). Valorização agrícola das lamas de ETARs de agro-indústrias através de compostagem. AGRO 70/2002.
- Silveira, A., Coucello, V., Correia, M. J. (2009). Compostagem de lamas de suiniculturas. DCEA/FFCT/UNL.
- Sinton, L. W., Braithwaite, R. R., Hall, C. H., Mackenzie, M. L. (2007). Survival of indicator and pathogenic bacteria in bovine feces on pasture. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 7917-7925.
- Soveral Dias J. C. (1998). Código de boas práticas agrícolas. Laboratório Químico-Agrícola Rebelo da Silva.

- Standard Methods (1992). For the Examination of Water and Wastewater. 18<sup>th</sup> Edition. Part 4000 Inorganic Nonmetallic Constituents. 4500P-phosphorus. Edited by Greenberg, A. E., Clesceri, L. S., Eaton, A. D.
- Stephan, R., Borel, N., Zweifel, C., Blanco, M., Blanco, J. E. (2004). First isolation and further characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) O157:H45 strains from cattle. *BMC Microbiology*, 6: 1-6.
- Taveira, N. C. (2000). Capítulo 1. Detecção e Identificação Molecular de Microrganismos, p. 3-37, in: *Microbiologia Volume 2*. Edições Lidel- Edições técnicas, Lda.
- Trabulsi, R. L., Keller, R., Gomes, T. A. T. (2002). Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, 8: 508-512.
- Turner, C. (2002). The thermal inactivation of *E. coli* in straw and pig manure. *Bioresource Technology*, 84: 57-61.
- Venglovsky, J., Martinez, J., Placha, I. (2006). Hygienic and ecological risks connected with utilization of animal manures and biosolids in agriculture. *Livestock Science*, 102: 197-203.
- Vernozy-Rozand, C, Montet, M. P., Lequerrec, F., Serillon, E., Tilly, B., Bavai, C., Ray-Gueniot, S., Bouvet, J., Mazuy-Cruchaudet, C., Richard, Y. (2002). Prevalence of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in slurry, farmyard manure and sewage sludge in France. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 473-478.
- Wallace, J. S., Chesty, T., Jones, K. (1997). Isolation of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. *Journal of Applied Microbiology*, 82: 399-404.
- Wasteson, Y. (2001). Zoonotic *Escherichia coli*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 95: 79-84.
- Welinder-Olsson, C., Kaijser, B. (2005). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 37: 405-416.
- Westerman, W. P., Bicudo, R. J., (2005). Management considerations for organic waste use in agriculture. *Bioresource Technology*, 96: 215-221.
- Wetzel, A. N., LeJeune, J. T. (2007). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 strains that do not produce Shiga toxin from bovine, avian and environmental sources. *Letters in Applied Microbiology*, 45: 504-507.
- Working Document on Sludge (2000). 3<sup>RD</sup> Draft, Brussels.

- Zhang, W., Bielaszewska, M., Kuczius, T., Karch, H. (2002). Identification, characterization, and distribution of a shiga toxin 1 gene variant (*stx<sub>1c</sub>*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 1441-1446.
- Zweifel, C, Schumacher, S., Blanco, M, Blanco, J. E, Tasara, T., Blanco, J, Stephan, R. (2005). Phenotypic and genotypic characteristics of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from Swiss cattle. *Veterinary Microbiology*, 105: 37-45.